

Luun morfogeneettisen proteiini 4:n vaikutukset rinta- ja haimasyöpäsolujen kasvuun
ja proteiiniekspressioon kolmiulotteisessa kasvatuksessa

Hanna-Kaarina Juppi

Pro gradu-tutkielma

Tampereen yliopisto

Biolääketieteellisen teknologian yksikkö

Solu- ja kudosteknologian maisteriohjelma

29.4.2014

Alkusanat

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikössä syöpägenomiikan tutkimusryhmässä lukuvuoden 2013–2014 aikana. Haluan kiittää erityisesti professori Anne Kallioniemeä mahdollisuudesta päästä työskentelemään kiinnostavan ja ajankohtaisen aiheen parissa. Lisäksi haluaisin kiittää ohjaajaani FM Minna Ampujaa, avusta ja ohjeistuksesta kokeiden suorittamisessa. Myös muilta ryhmän jäseniltä sain tukea ja kullanarvoisia ohjeita työskentelyyn.

Lopuksi haluaisin kiittää vielä ystäviäni ja perhettäni suuresta tuesta opintojen aikana sekä parasta ystävääni Lilaa, joka vei minut tutkielman kirjoitusprosessin aikana ulos niin sateella kuin paisteellakin.

Tampereella 29.04.2014

Hanna-Kaarina Juppi

PRO GRADU- TUTKIELMA

Paikka:	TAMPEREEN YLIOPISTO, Biolääketieteellisen teknologian yksikkö
Tekijä:	JUPPI, HANNA-KAARINA
Työn nimi:	Luun morfogeneettisen proteiini 4:n vaikutukset rinta- ja haimasyöpäsolujen kasvuun ja proteiiniekspressioon kolmiulotteisessa kasvatuksessa
Sivumäärä:	59 s.
Ohjaajat:	Professori Anne Kallioniemi, FM Minna Ampuja
Tarkastaja:	Riitta Seppänen
Päivämäärä:	Huhtikuu 2014

Tiivistelmä

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi Suomessa ja maailmalla. Haimasyöpä on rintasyöpää huomattavasti harvinaisempi syöpätyyppi, mutta siihen liittyvä kuolleisuus lähentelee 100 %. Molempiin syöpätyyppeihin liittyvä tutkimus on runsasta, mutta erityisesti haimasyöpään liittyvä lääkkeiden kehitys on hidasta. Perinteiset kaksikulotteiset soluviljelyalustat tuottavat tuloksia, joita ei täysin voi yleistää elimistön normaaleihin reaktioihin. Kolmiulotteinen soluviljely tarjoaa luotettavampia tuloksia lääketieteen tarpeisiin. Luun morfogeneettiset proteiinit (BMP:t) on varsinkin viime aikoina liitetty monien syöpien, kuten rinta- ja haimasyövän kehittymisen eri vaiheisiin. BMP-proteiinien tiedetään olevan tärkeitä luuston kehittymiselle, mutta niillä on tehtäviä myös alkionkehityksen muissa vaiheissa ja aikuiskudoksen homeostaasissa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia BMP4-proteiinin vaikutuksia rinta- ja haimasyöpäsolujen kasvuun ja proteiiniekspressioon kolmiulotteisessa soluviljelymallissa.

Tutkimusmenetelmät: Rintasyöpäsoluja (BT-474, T-47D ja MDA-MB-231) ja haimasyöpäsoluja (MIA PaCa-2 ja PANC-1) kasvatettiin 14 vuorokautta Matrigelissä ja käsiteltiin 100 ng/ml ihmisen rekombinantilla BMP4-proteiinilla tai kuljettimella. Soluja kuvattiin kasvatuksen aikana solujen viemän pinta-alan määrittämiseksi ja aineenvaihdunnan aktiivisuutta mitattiin Alamar Blue-kokeella. Solujen tuottamien proteiinien tutkimiseksi ja solunsisäisten signaalintireittien aktiivisuuden määrittämisessä käytettiin Western Blot-menetelmää.

Tutkimustulokset: BMP4-käsittelyn vaikutukset olivat solulinjaspesifejä. Rintasyöpäsoluissa BMP4 vähensi merkittävästi kaikkien tutkittujen solulinjojen kasvua ja lisäsi Smad-reitin aktiivisuutta BT-474- ja MDA-231-soluissa. PANC-1-haimasyöpäsolulinjassa BMP4-käsittely lisäsi Smad-reitin aktiivisuutta jopa kymmenkertaisesti, mutta MIA Paca-2-soluissa vain 1.3-kertaisesti. p21-aktivaation havaittiin kasvavan 1.3-kertaiseksi PANC-1-soluilla.

Johtopäätökset: BMP4:n vaikutukset eri syöpätyyppien soluihin vaihtelevat solulinjaspesifisesti. Rintasyöpäsoluissa kasvutekijä vähentää solujen kasvua selvästi, mutta haimasyöpäsoluissa kasvun vähentyminen riippuu solulinjasta. Rinta- ja haimasyöpäsoluissa BMP4 aktivoi Smad-reitin solulinjariippuvaisesti sekä vaikuttaa solusykli-inhibiittori p21:n aktivoitumiseen haimasyöpäsoluissa solulinjariippuvaisesti. Yhteenvetona, BMP4 vaikuttaa molempien syöpätyyppien toimintaan, mutta vaikutukset riippuvat tutkitusta solulinjasta.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE, Institute of Biomedical Technology
Author: JUPPI, HANNA-KAARINA
Title: The effects of bone morphogenetic protein 4 on the growth and protein expression of breast and pancreatic cancer cells in three-dimensional culture
Pages: 59 p.
Supervisors: Professor Anne Kallioniemi, MSc Minna Ampuja
Reviewers: Riitta Seppänen
Date: April 2014

Abstract

Background and aims: Breast cancer is the most common cancer in Finland and in many other western countries. Pancreatic cancer is more uncommon, but the mortality rate related to this cancer type is close to 100 %. The research related to both cancer types is intense, but especially for pancreatic cancer drug development is slow. Traditional twodimensional cell culturing provides results that cannot be directly extrapolated to normal reactions in the body. Three dimensional cell culture provides more reliable results for medicinal use. Bone morphogenetic proteins (BMPs) have been implicated in the various steps of cancer development in for example breast and pancreatic cancer. BMP proteins are known to have a vital role in bone development, but they also play a part in other embryonic developmental stages and in adult tissue homeostasis. The aim of this study was to examine the effects of BMP4 on the growth and protein expression of breast and pancreatic cancer cells.

Methods: Three breast cancer cell lines (BT-474, T-47D and MDA-MB-231) and two pancreatic cancer cell lines (MIA PaCa-2 and PANC-1) were cultured in Matrigel for 14 days and treated with 100 ng/ml human recombinant BMP4 protein or vehicle. While culturing, cells were imaged for area analysis and the rate of metabolic activity was measured with Alamar Blue assay. Western Blot was used to study protein expression and the activity of intracellular BMP signaling pathways.

Results: The effect of BMP4 treatment was cell line specific. In breast cancer cells BMP4 reduced the growth significantly in all studied cell lines and increased the activity of Smad pathway in BT-474 and MDA-MB-231 cell lines. In PANC-1 BMP4 increased the activity of Smad pathway up to 10-fold but in MIA PaCa-2 the increase was only 1.3-fold. p21 activation was increased 1.3-fold in PANC-1 cell line with BMP4 treatment when compared to vehicle.

Conclusions: The effects of BMP4 to different cancer type cells vary cell line specifically. In breast cancer cells the growth factor significantly reduces growth but in pancreatic cancer cells the decrease depends on the cell line. Both in breast and pancreatic cancer cells, BMP4 activates the Smad pathway also cell line specifically and in pancreatic cancer cells p21 induction depends on the cell line studied. In conclusion, BMP4 affects the functions in the cells in both cancer types but the ways of action are dependent on cellular background.

Sisällysluettelo

Alkusanat.....	2
Tiivistelmä.....	3
Abstract.....	4
Käytetyt lyhenteet.....	6
1. Johdanto.....	7
1.1. Rintasyöpä.....	7
1.2. Haimasyöpä.....	9
1.3. Miten syöpä syntyy.....	10
1.4. Kolmiulotteinen soluviljely.....	11
1.4.1. Käytettyjä materiaaleja.....	12
1.4.2. Matrigel.....	13
1.4.3. Eroja 2D-malliin.....	14
1.5. Luun morfogeneettiset proteiinit.....	16
1.5.1. Rakenne ja tehtävät.....	16
1.5.2. Signaalintireitit.....	18
1.6. BMP:t syövissä.....	21
1.7. BMP4 rinta- ja haimasyövissä.....	25
2. Tutkimuksen tarkoitus.....	28
3. Materiaalit ja menetelmät.....	29
3.1. Solulinjat ja niiden kasvatus.....	29
3.2. Kolmiulotteinen soluviljely.....	30
3.3. BMP4-käsittely.....	31
3.4. Solujoukkojen koon, kasvun ja muodon analysointi.....	31
3.5. Proteiinien keräys.....	32
3.6. Western Blot.....	32
3.7. PCR.....	33
3.8. Immunofluoresenssileimaus.....	33
3.9. Kaksiulotteinen soluviljely.....	34
3.10. Tilastomenetelmät.....	34
4. Tulokset.....	35
4.1. BMP4:n vaikutukset rintasolujen kasvuun.....	35
4.2. BMP4:n vaikutukset haimasolujen kasvuun.....	36
4.2.1. BMP4:n vaikutukset normaaliin immortalisoituun haimasolulinjaan.....	36
4.2.2. PANC-1.....	42
4.2.3. MIA PaCa-2.....	45
5. Tulosten tarkastelu.....	49
5.1. BMP4:n vaikutukset rintasoluihin.....	49
5.2. BMP4:n vaikutukset haimasoluihin.....	50
6. Yhteenveto.....	51
Kirjallisuus.....	54

Käytetyt lyhenteet

BSA	Naudan seerumin albumiini (<i>Bovine serum albumin</i>)
BMP4	Luun morfogeneettinen proteiini 4 (<i>Bone morphogenetic protein 4</i>)
FBS	Naudan sikiön seerumi (<i>Fetal bovine serum</i>)
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenyyli-indoli, sinisellä aallonpituudella fluoresoiva DNA:han sitoutuva molekyyli
ECM	Soluväliaine (<i>Extra cellular matrix</i>)
TGF- β	Transformoiva kasvutekijä β (<i>Transforming growth factor β</i>)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (<i>Phosphate buffered saline</i>)

1. Johdanto

Erilaiset syöpätyypit koskettavat ihmisiä ympäri maailman, iästä ja kansallisuudesta riippumatta. Tutkimus syöpäsairauksiin liittyen on runsasta, sillä niiden synnyn mekanismien selvittämiseksi on vielä paljon työtä. Rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi Suomessa, sillä noin joka kolmas naisten syövästä on rintasyöpää (<http://www-dep.iarc.fr/nordcan.htm>, viitattu 21.4.2014). Rintasyövän hoito on kuitenkin suhteellisen kehittyntä, mutta rintasyövän ennustetaan yleistyvän väestössä jatkossa (Joensuu ym. 2007). Haimasyöpä sen sijaan on rintasyöpää huomattavasti harvinaisempi syöpätyyppi, sillä riski sairastua siihen on 3-4 % luokkaa (<http://www-dep.iarc.fr/nordcan.htm>, viitattu 21.4.2014). Haimasyövän hoidon tehokkuus on kuitenkin heikkoa ja syöpään liittyvä kuolleisuus lähentelee 100 % viiden vuoden kuluttua diagnoosista (Joensuu ym. 2007). Nämä kaksi syöpätyyppiä ovat luonteeltaan siis hyvin erilaisia, mikä tekee niistä väestöntasolla kiinnostavia tutkimuskohteita.

Syöpäsoluja on tutkittu runsaasti käyttäen kaksiulotteista kasvatusalustaa. Elimistössä ja kudoksissa solut kasvavat kuitenkin kolmiulotteisessa ympäristössä joten tutkimuksista saadut tulokset saattavat olla harhaanjohtavia (Smalley ym. 2006, Yamada & Cukierman 2007). Tutkimusmenetelmien kehittymisen myötä perinteisten soluviljelyalustojen rinnalle on kehitetty kolmiulotteisia kasvatusmalleja ja materiaaleja, jotka matkivat luonnollisten kudosten ominaisuuksia paremmin. Tiedetään että monien signaalintireittien aktiivisuus riippuu solujen ympäristöstä ja että solujen vaste esimerkiksi kasvutekijöihin riippuu niiden kasvuympäristöstä (Smalley ym. 2006, Hongisto ym. 2013). Yksi esimerkki tällaisesta on luun morfogeneettisen proteiini 4:n (BMP4, *Bone morphogenetic protein 4*) kasvualustasta riippuvat vaikutukset rintasyöpäsolujen kasvuun (Ampuja ym. 2013).

1.1. Rintasyöpä

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa ja Pohjois-Amerikassa toiseksi eniten naisten kuolemia aiheuttava syöpätyyppi (Pouliot & Labrie 2002, Joensuu ym. 2007, Siegel ym. 2013). Suomessa rintasyövän osuus kaikista naisten syövästä on 31,2 % ja sairastumisriski 75 ikävuoteen mennessä on 9,7 %. Suhteellinen elossaolo-osuus vuoden päästä diagnoosista on 96 % ja viiden vuoden päästä 86 % (Joensuu ym. 2007). Rintasyöpää esiintyy eniten yli 60-vuotiaiden ikäryhmässä (noin 50 % tapauksista). Noin neljännes potilaista on 25–49-vuotiaita ja toinen neljännes 50–59-vuotiaita (<http://www.cancer.fi>, viitattu 21.4.2014). Rintasyöpäriskiin vaikuttavat synnytysten

lukumäärä, kuukautisten alkamis- ja loppumisikä, erilaiset hormonihoitot ja mahdollisesti myös ehkäisytablettien käyttö (McPherson ym. 2000, Joensuu ym. 2007). Runsas altistuminen ionisoivalle säteilylle, esimerkiksi säteilyonnettomuuden yhteydessä, tai varhain lapsuudessa tai nuoruudessa annettu sädehoito rinnan alueelle lisäävät myös sairastumisriskiä. Mainitut tekijät lisäävät riskiä sairastua rintasyöpään, mutta silti yli puolella rintasyöpäpotilaista ei ole yhtään yllämainittua riskitekijää (<http://www.cancer.fi>, viitattu 21.4.2014). Päihteistä alkoholin käyttö ja tupakointi lisäävät riskiä sairastua tähänkin syöpään (McPherson ym. 2000, Joensuu ym. 2007). Rinnan kasvanut tiheys altistaa rintasyöville, sillä n.30 %:ssa rintakarsinoomista havaitaan tämä muutos. Kasvanut tiheys johtaa 4-6 kertaiseen riskiin sairastua rintasyöpään (Wozniak & Keely 2005).

Suomessa n.5 % diagnosoiduista rintasyöivistä on perinnöllisiä ja noin joka kolmanteen näistä liittyy mutaatio *BRCA1*-tai *BRCA2*-geenissä (Joensuu ym. 2007). Rintojen poisto periytyvän rintasyövän tapauksessa pienentää riskiä sairastua yli 90 % ja munasarjojen poisto rintasyöpään sairastumista yleensä n.50 %. Rintasyövän diagnoosiin liittyy usein syöpäkudoksen estrogeeni (ER)- ja progesteronireseptorimääritys (PgR). Rintasyöivistä noin 70 % on ER-positiivisia ja useimmissa näissä ilmentyy myös progesteronireseptori. Lisäksi rintasyöivistä voidaan määrittää *HER-2*-geenin monistuminen. Tätä geeniä voimakkaasti ilmentävät rintasyövät uusiutuvat keskimääräistä nopeammin (Joensuu ym. 2007).

Rintasyöpä on vahvasti hormonaalinen syöpä, sillä rintasyöpäsolujen jakaantumista säätelevät steroidihormonit ja kasvutekijät. Erityisesti estrogeenit lisäävät estrogeenireseptoreja ilmentävien rintasyöpätyyppien kasvua ja estrogeenien vaikutusten estäminen onkin tällä hetkellä rintasyövän tärkeimpiä lääkinnällisiä hoitokeinoja (Pouliot & Labrie 2002). Rinnassa on 15–20 rauhasliuskaa (lobulusta), joita erottaa sidekudoksinen väliseinä. Lobuluksia yhdistävät toisiinsa pienet tiehyet eli duktukset. Tavallisin rintasyövän muoto (n.70 % tapauksista) alkaa tiehyiden soluista, jolloin sitä kutsutaan duktaaliseksi karsinoomaksi (Wozniak & Keely 2005, Joensuu ym. 2007).

Rauhasliuskoista peräisin olevaa syöpämuotoa kutsutaan lobulaariseksi karsinoomaksi ja sillä on muihin rintasyöpätyyppeihin verrattuna hieman suurempi taipumus esiintyä molemmissa rinnoissa (Joensuu ym. 2007).

Diagnoosihetkellä rintasyöpäpotilailla n.10 %:lla todetaan etäpesäkkeitä muissa elimissä. Rintasyöville tyypillisiä etäpesäkekeudoksia ovat luusto, imusolmukkeet, iho, keuhkot, maksa ja aivot (Joensuu ym. 2007).

1.2. Haimasyöpä

Haimasyöpä on vakava syöpäsairaus, joka on yleistymässä Suomessa tuntemattomasta syystä (<http://www.cancer.fi>, viitattu 21.4.2014). Suomessa ja Yhdysvalloissa haimasyövän osuus kaikista syövistä molemmilla sukupuolilla on noin 3 % (Siegel ym. 2013, <http://www-dep.iarc.fr/nordcan.htm>, viitattu 21.4.2014). Haimasyövän riski on matala alle 50-vuotiailla, mutta kasvaa nopeasti tämän iän jälkeen. Yhdysvalloissa ja Englannissa haimasyövän diagnoosin mediaani-ikä on 71–72 vuotta, mikä tarkoittaa sitä että noin puolet potilaista on tätä ikää vanhempia diagnoosihetkellä (Wormann & Algul 2013). Sairastumisriski 75 ikävuoteen mennessä on noin yhden prosentin luokkaa kummallakin sukupuolella. Taudin ennuste on huono, sillä syöpä havaitaan usein vasta myöhäisessä vaiheessa. Eloisaolo-osuus vuoden päästä diagnoosista on 23–28 % ja viiden vuoden päästä 1,8–6 % (Joensuu ym. 2007, Hermann ym. 2007). Haimasyöpä on noin 30 % yleisempi miehillä kuin naisilla. Ero saattaa johtua lähinnä elintapojen erilaisuudesta, kuten alkoholin käytöstä tai tupakoinnista, sillä ainakaan toistaiseksi ei ole havaittu taudin esiintymisen riippuvan hormonaalisista tekijöistä (Wormann & Algul 2013).

Sairastuvuus haimasyöpään lisääntyy iän myötä. Lisäksi riskiä lisäävät myös diabetes, runsasrasvainen ja kolesterolinen ruokavalio sekä altistuminen karsinogeeneille. Yhdysvalloissa valkoihoisilla on havaittu pienempi riski sairastua haimasyöpään kuin muilla roduilla ja Havaijilla alkuperäisasukkailla ilmaantuvuus on kaksinkertainen valkoihoisiin ja japanilaisiin verrattuna (Joensuu ym. 2007, Wormann & Algul 2013). Haimasyövän esiintymisriski on korkeampi afrikanamerikkaisilla kuin valkoihoisilla, mikä saattaa kuitenkin selittyä eri kansojen erilaisilla elintottumuksilla, kuten tupakoinnilla ja ylipainolla. Tupakointi on haimasyövän suurimpia riskitekijöitä ja sen on arvioitu olevan vastuussa n.20–30%:ssa kaikista haimasyöpätapauksista. Ylipainoisilla ihmisillä riski sairastua haimasyöpään on noin 20 % korkeampi kuin normaalipainoisilla. Monissa tutkimuksissa on lisäksi käynyt ilmi, että kroonista hepatiitti B:tä tai C:tä tai *Helicobacter pylori*-infektiota sairastavilla on kasvanut riski sairastua (Wormann & Algul 2013).

Haimasyövät voidaan jakaa pääasiallisesti kahteen eri ryhmään: duktaaliseen adenokarsinoomaan (80–97 % tapauksista) ja harvinaisempaan saarekesolusyöpään (Joensuu ym. 2007).

Diagnoosihetkellä syöpä on usein jo levinnyt muualle elimistöön ja 75 %:ssa tapauksista etäpesäkkeitä löytyy imusolmukkeista. Tavallisia haimasyövän etäpesäkkeiden löytymispaikkoja ovat maksa, keuhkot, vatsakalvo ja lisämunuaiset. Leikkaushoito on ainoa tapa yrittää parantaa

haimasyöpäpotilaat. Leikkaus voi olla joko täysin parantamiseen pyrkivä tai oireita lievittävä.(Joensuu ym. 2007)

Vaikka suurin osa haimasyövistä esiintyykin sattumanvaraisesti, noin 10 % tautitapauksia on voitu havaita olevan perinnöllinen, geneettinen pohja. Periytyvässä rintasyövässä tunnetun *BRCA2*-geenin mutaatio lisää myös haimasyövän todennäköisyyttä jopa 3–10-kertaisesti ja nämä tapaukset vastaavat noin 5–17 % tunnetuista periytyvistä haimasyövistä (Wormann & Algul 2013).

1.3. Miten syöpä syntyy

Syöpä saa alkunsa kun solut alkavat lisääntyä kontrolloimattomasti. Prosessi on monivaiheinen, mutta useimmille syöpätyypeille yhteisiä piirteitä ovat erilaisten mutaatioiden synty DNA:ssa, perimän korjausmenetelmien pettäminen ja esimerkiksi tiettyjen kasvunrajoitegeenien epigeneettinen säätely. On arvioitu, että syöpäkasvaimen synty edellyttää noin 3-7 tiettyihin solujen keskeisiin toimintoihin kohdistuvaa mutaatiota perimässä (Joensuu ym. 2007). Varsinaisissa syöpäkasvaimissa havaitaan kuitenkin usein vaihtelevia määriä mutaatioita. Esimerkiksi keuhkosityövissä erilaisia mutaatioita voi olla reilusti yli 100, kun taas rintasyövistä löydetään keskimäärin 30 mutaatiota (Vogelstein ym. 2013). Mutatoituneet solut välttävät elimistön kasvunsaätelymekanismit tavalla tai toisella ja alkavat lisääntyä rajoittamattomasti. Jakautumiskertojen myötä perimään syntyy yhä uusia mutaatioita. Mutaatioita tuottavat muun muassa erilaiset karsinogeenit, säteily, tietyt virukset ja solun oman aineenvaihdunnan kautta syntyneet metaboliatuotteet. Syövän synnylle keskeiset DNA-vauriot eivät kuitenkaan synny sattumanvaraisesti minne tahansa genomiin, vaan erityisesti sellaisiin geeneihin, joiden viallinen toiminta johtaa solujen rajattomaan kasvuun. Näitä kutsutaan syöpägeeneiksi ja pohjimmiltaan ne ovat solun normaalia kasvua sääteleviä geenejä (Joensuu ym. 2007).

Syöpäsoluille ominainen piirre on niiden kyky migroitua ja invasoida erilaisia kudoksia. Syövän kehittymisen aikana pahanlaatuiset solut menettävät kontaktiriippuvuutensa, mikä mahdollistaa niiden liikkumisen elimistössä kudoksesta toiseen verenkierron tai imusuoniston avulla. Tämä tuottaa etäpesäkkeitä. Primaarikasvaimessa ja uudessa kohdekudoksessa soluilla on tarve taata hapen ja ravinteiden saanti verisuonituksen avulla. Aikuisilla yksilöillä verisuonten uudismuodostusta eli angiogeneesiä esiintyy lähinnä haavan paranemisen yhteydessä ja joissain sairauksissa, kuten syövässä. Angiogeneesi saattaa alkaa missä tahansa syövän kehittymisen vaiheessa, mutta se riippuu vahvasti kasvaimen tyypistä ja solujen mikroympäristöstä. (Deer ym. 2010, Singh & Morris 2010)

Moniin syöpiin liittyy myös epiteelisolujen kyky karistaa erilaistuneen solun ominaisuutensa, kuten solu-solu-liitokset, polariteetin ja liikkumattomuuden. Kun solut saavuttavat mesenkymaalitilan parantuneen liikkumis- ja invaasiokyvyn, prosessia kutsutaan epiteeli-mesenkymaalitransitioksi (EMT). EMT:n merkinä pidetään vähentyneitä E-kadheriinin ja lisääntyneitä vimentiniin ilmentämistä sekä juurikin parantunutta liikkuvuutta ja invaasiokykyä (Polyak & Weinberg 2009). E-kadheriini on solu-soluliitosten tärkeä komponentti, jota tarvitaan alkion epiteelikudoksen muodostumisessa ja aikuisella epiteelin homeostaasissa. E-kadheriinin ilmentymisen loppuminen tai vähentyminen voi johtua somaattisista mutaatioista, kromosomaalisista deleetioista, geenin hiljentymisestä tai proteiinin hajottamisesta (Kang & Massague 2004, Polyak & Weinberg 2009). 42–60 %:ssa ihmisen haiman duktaaliadenokarsinoma-näytteistä havaitaan joko vähentynyt tai kokonaan loppunut E-kadheriinin ilmentyminen ja tällä on merkittävä korrelaatio etäpesäkkeiden muodostumiseen (Arumugam ym. 2009, von Burstin ym. 2009). Vimentiini kuuluu välikokoisten säikeiden perheeseen ja sitä ekspressoidaan runsaasti normaaleissa mesenkymaalisissa soluissa, jossa se suojaa soluja stressiltä ja antaa tukea. Vimentiiniä yliekspressoidaan lisäksi monissa syövässä, kuten eturauhasen syövässä, rintasyövässä, kohdunkaulansyövässä ja melanoomassa. Erityisesti haimasyövästä on löydetty huomattavasti suuremmat vimentiinin ekspressiotasot kuin muista syöväistä. Vimentiinin yliekspressio korreloi hyvin kasvaimen kiihtyneeseen kasvuvauhtiin, invaasioon ja huonoon ennusteeseen (Satelli & Li 2011).

1.4. Kolmiulotteinen soluviljely

Solut kasvavat elimistössä soluväliaineen (ECM, *extra cellular matrix*) ympäröimänä. Soluväliaine erottaa kudokset toisistaan, tukee epiteelin ja endoteelin kasvua ja huolehtii ympäristön oikeista viesteistä. Eritetyt glykoproteiinit, glykosaminoglykaanit ja erilaiset proteiinit muodostavat verkoston, joka erilaisissa tiheyksissään sisältää runsaasti biofysikaalista informaatiota (Hughes ym. 2010, Gasiorowski ym. 2013). Solut ovat soluväliaineen kanssa yhteydessä pääasiassa integrinien ja syndekaanien kautta, sillä nämä toimivat reseptoreina soluväliaineen ligandeille ja kasvutekijöille. Integrinit indusoivat fokaaliadheesioiden, fibrillaaristen adheesioiden ja mm. invadopodien syntyä (Takino ym. 2013, Jacquemet ym. 2013). Epiteeli- ja endoteelisolujen pääasiallinen solu-ECM-kontakti syntyy solujen basaalipuolen ja topografisesti runsaan tyvikalvon kanssa. Tyvikalvo on ohut, erikoistunut kerros soluväliainetta ja sen paksuus vaihtelee 50–150nm välillä kudoksesta riippuen (Gasiorowski ym. 2013). Tyvikalvo koostuu laminiinista, kollageeni IV:stä, perlekaanista ja muista ei-kuituisista matriksin komponenteista. Mesenkymaalinen soluväliaine taas muistuttaa enemmän kuituista verkkoa, jossa esiintyy runsaasti kollageeni III:sta ja

fibronektiiniä (Serebriiskii ym. 2008). Soluväliaineen komponentit eivät vaikuta vain kemiallisen koostumuksensa vuoksi solujen käyttäytymiseen vaan myös biofysikaalisten rakenteidensa avulla (Gasiorowski ym. 2013).

Yleisesti käytetty kaksikulotteinen, soluviljelymuovilla tapahtuva solujen kasvatus ei vastaa solujen normaaleja olosuhteita elimistössä. Täten myöskään näistä tutkimuksista saatuja tuloksia ei täysin voi yleistää elimistön tapahtumiin. Kolmiulotteisten kasvatusmateriaalien tarkoituksena on matkia kudoksien olosuhteita niin koostumukseltaan kuin kolmiulotteisuudellaankin. Tutkimuksissa on todettu, että esimerkiksi epiteelikasvainsolut kasvavat kaksikulotteisella, mutta kemialliselta koostumukseltaan soluväliainetta muistuttavalla alustalla samankaltaisesti kuin soluviljelymuovilla (Serebriiskii ym. 2008). Tietyt ominaisuudet saavuttaakseen solujen täytyy siis olla soluväliaineen ympäröimiä. Viime aikoina on käynyt ilmi, että soluväliaineen jäykkyys ja topologia vaikuttavat solujen integriini-signaalointiin ja fenotyyppiin (Kenny ym. 2007, Takino ym. 2013). Solut tuntevat ympäristönsä elastisuuden solujen pinnan integriinien ja toisaalta solujen sisäisten solutukirangan komponenttien avulla. Matriksin jäykkyys ja sen vaikutukset solujen supistumiskykyyn tai entsyymaattisiin hajotusprosesseihin vaikuttavat solujen pinnan integriinireseptorien ilmentymiseen ja solun sisällä syntyviin tukirakennelmiin. Matriksin jäykkyys vaikuttaa myös solunsisäiseen signaalointiin Rho-kinaasin ja Racin kautta. Elimistössä solujen luonnollisen kasvualustan jäykkyydessä on suuria eroja mm. pehmeän rasvakudoksen ja esimerkiksi luukudoksen välillä (Yamada & Cukierman 2007). Kasvatusmatriksin jäykkyyttä säätelemällä voidaan ohjata esimerkiksi kantasolujen erilaistumista tai rintasolujen luumenien muodostusta (Gasiorowski ym. 2013).

1.4.1. Käytettyjä materiaaleja

Kolmiulotteisen kasvatusmateriaalin täytyy täyttää tietyt kriteerit sopiakseen solujen kasvatukseen ja tutkimukseen. Materiaalin on oltava bioyhteensopiva eli se ei saa olla soluille myrkyllinen tai muuten haitallinen. Lisäksi on tärkeää että solut voivat kiinnittyä materiaaliin toimiakseen luonnollisesti (Lee ym. 2008, Haycock 2011). Kolmiulotteisia soluviljelymateriaaleja on kehitelty sekä synteettisiä että biologista alkuperää olevia. Synteettisiä soluviljelyalustoja ovat esimerkiksi polyetyleeniglykoli (PEG), polyhydroksyetyylimetakrylaatti, polyakryyliamidi, polylaktidiglykolihappo (PLGA) ja polyglykolihappo (PGA). Synteettisiä materiaaleja käytetään usein hydrogeeleinä, sillä ne tukevat solujen kasvua hyvin. Luonnollisiin, elävistä soluista eristettyihin materiaaleihin kuuluvat mm. Matrigel, kollageeni, fibronektiini, gelatiini ja hyalhyronaatti (Lee ym. 2008, Gasiorowski ym. 2013). Lisäksi erityisesti syöpätutkimuksen avuksi

on viimeaikoina tullut kudoksen stroomassa runsaasti luonnollisesti esiintyvien fibroblastien tuottamaa soluväliainetta (Serebriiskii ym. 2008). Materiaaleja voidaan käyttää joko yksistään tai yhdistelemällä useampaa materiaalia keskenään. Lisäksi varsinkin viime aikoina on yleistynyt useiden solutyypin viljely samassa soluviljelmässä. Tästä esimerkkinä toimii ihmisen ihosta tehty 3D-malli, jossa keratinosyyttejä ja fibroblasteja kasvatetaan syöpäsolujen kanssa melanooman synnyn tutkimiseksi (Yamada & Cukierman 2007).

Synteettisten hydrogeelien käyttöön liittyy monia hyviä puolia. Materiaalien kemiallista koostumusta on helppo muokata ja mikä tärkeää, niiden koostumus voidaan selvittää tarkasti (Gasiorowski ym. 2013). Kokeista saatuja tuloksia voidaan myös helpommin verrata toisiinsa, kun kasvatusmateriaalin tiedetään pysyneen täsmälleen samana. Lisäksi synteettiset lähtömateriaalit helpottavat kokeiden tulosten tulkitsemista, esimerkiksi rustosolujen tuottaman soluväliaineen koostumuksen määrittämisessä, kun tiedetään, ettei vastaavia aineita esiinny kasvatusmatriksissa (Lee ym. 2008). Toisaalta, synteettiset kasvatusalustat ovat aina synteettisiä, joten ne eivät voi täysin mimikoida oikeita elimistön olosuhteita.

Luonnollista alkuperää olevat kasvatusmateriaalit poikkeavat synteettisistä materiaaleista siinä että niitä esiintyy normaalistikin solujen kasvuympäristössä. Esimerkiksi runsaasti käytetty kollageeni on elimistön yksi yleisimmistä proteiineista ja täten osa monien solujen luonnollista soluväliainetta (Liu ym. 2013). Luonnolliset materiaalit ovat pääsääntöisesti myös bioyhteensopivia, sillä soluille on kehittynyt ominaisuuksia, joilla ne voivat käsitellä ympäristönsä molekyyliä. Monia eri soluväliaineen komponentteja sisältävät Matrigel ja esimerkiksi fibroblastien tuottama soluväliaine sisältävät tärkeiden proteiinien lisäksi myös monia kasvutekijöitä ja hormoneja solujen toiminnan tukemiseksi (Hughes ym. 2010). Luonnollisten materiaalien käyttöön solujen kasvatuksessa liittyy kuitenkin myös monia huonoja puolia. Erityisesti soluväliainemateriaaleissa esiintyy eroja eri erien välillä, mikä tekee tulosten yhdistämisestä vaikeampaa, sillä erot esimerkiksi kasvutekijöiden pitoisuuksissa saattavat vaikuttaa tiettyjen solutyypin toimintoihin. Lisäksi näiden materiaalien fysikaalisten ominaisuuksien muokkaaminen on vaikeaa, mikä rajoittaa niiden käyttöä tutkimuksessa. Luonnollisten materiaalien käyttöön liittyy myös vahvasti esimerkiksi mikrobikontaminaatioiden riski (Yamada & Cukierman 2007, Lee ym. 2008).

1.4.2. Matrigel

Matrigel on geolimäinen proteiiniseos, joka on peräisin hiiren Englebreth-Holm-Swarm-kasvainsoluista (Hughes ym. 2010). Matrigeliä käytetään runsaasti kantasolujen kasvatuksessa, sillä

se ylläpitää solujen erilaistumatonta fenotyyppiä. Matrigel koostuu pääasiassa laminiinista, kollageeni IV:sta ja enaktiinista, jotka ovat luonnollisen tyvikalvon komponentteja. Matrigel sisältää myös laajan joukon erilaisia kasvutekijöitä, kuten fibroblastien kasvutekijää, epidermaalista kasvutekijää, insuliinin tapaista kasvutekijä-1:stä, transformoivaa kasvutekijä- β :ta ja hermokasvutekijää. Hughes ym. tutkimuksessa Matrigelistä löydettiin 1851 erilaista proteiinia ja 14060 erilaista peptidiä. (Hughes ym. 2010)

Koska Matrigel on elävien solujen tuottamaa, sen koostumus vaihtelee erästä toiseen. Tämä saattaa aiheuttaa vaihtelua kokeen olosuhteisiin ja täten myös tuloksiin (Hughes ym. 2010). Lisäksi Matrigelin tiheyden, jäykkyyden ja topografisten ominaisuuksien muuntelu on vaikeaa (Wozniak & Keely 2005, Gasiorowski ym. 2013). Matrigel koostuu tyvikalvon komponenteista, mutta muistuttaa kuitenkin enemmän soluväliainetta kuin litteää ja ohutta tyvikalvokerrosta, mikä saattaa vaikuttaa solujen käyttäytymiseen (Yamada & Cukierman 2007).

Matrigelissä kasvatetut rinnan epiteelisolut kasvavat usein asinusmaisiksi, sillä Matrigelin komponentteja, tyypin I ja IV kollageenia ja laminiinia esiintyy luonnollisesti runsaasti rinnan tiehyiden ja asinusten soluväliaineessa (Debnath ym. 2003, Wozniak & Keely 2005).

1.4.3. Eroja 2D-malliin

Perinteiset 2D-kasvatusalustat rajoittavat solujen välisiä yhteyksiä, liukoisten aineiden vaihtoa, jätteiden poistoa ja solujen aineenvaihduntaa yleensä (Yamada & Cukierman 2007, Fang ym. 2013). Erityisesti rauhassolujen, kuten rinnan ja haiman solujen, oikeanlainen toiminta vaatii kolmiulotteista järjestäytymistä (Debnath ym. 2003, Yamada & Cukierman 2007). Näihin kuuluvat muun muassa sisältä onttujen asinusrakenteiden muodostuminen, asinussolujen apikobasaalinen polarisaatio ja tyvikalvon komponenttien (laminiini ja kollageeni IV) kerääntyminen basaalisesti (Debnath ym. 2003). Sen sijaan esimerkiksi epiteelisolujen normaali toiminta saattaa muistuttaa luonnollista tilaa myös oikein päällystetyillä ja muodostetuilla kaksikulotteisilla kasvatusalustoilla, sillä niiden normaali kasvualusta tyvikalvo on periaatteessa litteä (Yamada & Cukierman 2007).

Soluissa eroavat monet ominaisuudet sen mukaan onko niitä kasvatettu kaksi- vai kolmiulotteisessa ympäristössä. Tiedetään muun muassa, että solujen proteiiniekspressioprofiilit eroavat sen mukaan onko solujen kasvatusalustana käytetty yksikerroksista 2D-kasvatusta vai 3D-kasvatusalustaa. Eroavaisuuksia geeniekspressiossa on havaittu geeneissä, jotka liittyvät mm. signaalinvälitykseen, solujen liikkumiskykyyn, solujen väliseen signalointiin ja morfologiaan (Smalley ym. 2006, Hongisto ym. 2013). Tiedetään, että β 1-integriinin ja EGFR:n ekspressiotasot ja aktiivisuus ovat

alhaisia signaali-inhibiittoreilla käsitellyissä rintasyöpäsoluissa, mutta vain kun kasvatukset tapahtuvat 3D-kasvatusalustalla. Koska monia signaalinvälitykseen liittyviä proteiineja säädellään ennemmin fosforylaatiotasolla kuin ekspressiotasolla, on eri kasvatusalustojen välillä varmasti suurempiakin eroja kuin mitä geeniekspressiota tutkimalla saadaan selville (Kenny ym. 2007). On myös raportoitu merkittävistä eroista solujen apoptoosi-sensitiivisyydelle kemoterapeuttisten yhdisteiden vasteissa sekä normaaleilla että syöpäsoluilla 2D- ja 3D-kasvatusten välillä (Kenny ym. 2007, Serebriiskii ym. 2008, Hongisto ym. 2013). 2D-malleissa on huomattu myös mm. syövän kantasolujen epänormaalia jakaumaa ja epänormaaleja solujen välisiä vuorovaikutuksia (Liu ym. 2013). Lisäksi solun tukirangan säätely kasvatusympäristön mukaan vaikuttaa vahvasti solunsisäisiin signaalintireitteihin ja tämä aikaansaa eroja eri kasvatusmallien välillä (Smalley ym. 2006, Kenny ym. 2007).

3D-mallien etuihin 2D-viljelyyn ja eläinmalleihin verrattuna kuuluvat solujen morfologian ja signaalintitapahtumien parempi relevanssi fysiologisiin olosuhteisiin verrattuna, oikein muodostuvat solu-solu-interaktiot, koeolosuhteiden nopean muuttamisen mahdollisuus, hypoteesien testaaminen ja kasvatusten parempi kuvantamismahdollisuus (Yamada & Cukierman 2007, Liu ym. 2013). 3D-kasvatusalusta tukee myös solujen oikeanlaisen polariteetin muodostumista. Erityisesti epiteelisolut ovat usein polarisoituneita apikaali- ja basaalipintoineen, mikä on tärkeää kudosten järjestäytymiselle ja suuntautuneelle yhdisteiden tuotolle (Yamada & Cukierman 2007).

Nykyisellään kolmiulotteisen kasvatuksen huonoihin ominaisuuksiin kuuluvat hapen ja ravinteiden kuljetuksen ongelmat, pienten molekyylien normaalin kuljetuksen vähäisyys, erilaisten alustamateriaalien erot ja niiden vaikutus tulosten yleistettävyyteen sekä koe-asetelmien mahdollisuus mimikoida vain staattista tai lyhytaikaista tilannetta soluissa (Yamada & Cukierman 2007, Kenny ym. 2007). 3D-malleissa on lisäksi havaittu kemoresistenssiä, jonka syyksi on spekuloitu mm. lääkeresistenssistä vastaavien geenien ekspression lisääntymistä, lääkkeiden huonoa diffuusiota ja 3D-alustan indusoimaa solujen selviämistä edistävää signaalia (Hongisto ym. 2013). Tämä tosin saattaa olla vain solujen normaalia toimintaa kolmiulotteisessa kasvatuksessa.

Kolmiulotteinen soluviljelymalli tarjoaa hyvän työvälineen eläinkokeiden ja kaksikulotteisen soluviljelyn välille. Tiedetään että eläinkokeista saatuja tuloksia ei voida yksiselitteisesti yleistää ihmisten syöpien, lääkevästeiden, autoimmuunisairauksien ja esimerkiksi kantasolujen käyttäytymiseen (Kenny ym. 2007). Kaksikulotteinen soluviljely taas tarjoaa soluille epäluonnollisen kasvualustan. Kehittyvien kolmiulotteisten kasvatusmateriaalien kirjo tarjoaa sen sijaan työkalun esimerkiksi satojen tiettyyn solun prosessiin liittyvien ehdokasgeenien seulonnalle in vitro-

olosuhteissa. Tulevaisuudessa 3D-kasvatus voi toimia ideoiden yksinkertaisen kokeilun lisäksi myös ihmiskudosten suuren volyymin lääkekehityksen alustana (Yamada & Cukierman 2007).

1.5. Luun morfogeneettiset proteiinit

Luun morfogeneettisten proteiinien (BMP) perhe koostuu 21 tunnistetusta jäsenestä (BMP2-7, BMP8A/B, BMP10, BMP15, GDF1-3, GDF5-7, myostatiini, GDF9-11 ja GDF15) ja muodostaa transformoivan kasvutekijä (TGF)- β -superperheen suurimman alaryhmän (Alarmo & Kallioniemi 2010, Bragdon ym. 2011). Proteiinit löydettiin ensimmäisen kerran luun soluväliaineesta 1960-luvulla, jolloin kyseisen soluväliaineen havaittiin kykenevän uudisluun muodostamiseen. Vuonna 1988 Wozney ym. eristivät ja tunnistivat proteiinit luusta, havaitsivat niiden kyvyn indusoida luun ja ruston muodostumista ja nimesivät ne BMP-proteiineiksi (Singh & Morris 2010). Nykyään proteiinien toiminnan laajuudesta tiedetään enemmän ja nimeä onkin ehdotettu muutettavaksi elimistön morfogeneettisiksi proteiineiksi (Body Morphogenetic Proteins). Osaa BMP-proteiineja kutsutaan myös kasvu- ja erilaistumistekijöiksi (growth and differentiation factors, GDF) (Alarmo & Kallioniemi 2010). Vaikka BMP-proteiineilla onkin tiettyjä fundamentaalisia samankaltaisuuksia muiden TGF- β -superperheen jäsenten kanssa, BMP-proteiinien tuottamat signaalintimekanismit ja niiden säätely ovat omaa laatuaan muihin superperheen jäseniin verrattuna (Bragdon ym. 2011).

1.5.1. Rakenne ja tehtävät

BMP-proteiinit syntetisoidaan suurina 400–500 aminohapon esiasteproteiineina (Bragdon ym. 2011). Niiden aminopäässä sijaitsee erittämisen signaalipeptidi, keskellä prodomeeni ja C-terminaalinen pää koostuu varsinaisesta kypsästä peptidistä. Karboksyylipäässä sijaitsevat kypsät proteiinit leikataan proteolyttisesti Arg-X-X-Arg-sekvenssin kohdalta. Aktiiviset BMP:t koostuvat 50–100 aminohapon pituisesta polypeptidistä, jossa on seitsemän kysteiinitähdettä. Kuusi näistä tähteistä muodostaa disulfidisidoksia molekyylin sisällä. Seitsemäs kysteiini tarvitaan dimerisaation aikana muodostamaan sidos toisen BMP-proteiinin vastaavan parittoman kysteiinin kanssa ja täten muodostamaan biologisesti aktiivisen molekyylin. Muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta (BMP3, GDF9 ja BMP15) molekyylit muodostavat homo- tai heterodimeerejä (Singh & Morris 2010, Bragdon ym. 2011, Owens ym. 2013). Heterodimeerit (muun muassa BMP4/7 ja BMP2/5) vaikuttavat olevan jopa tehokkaampia signaalintireittien aktivoijia kuin niitä vastaavat homodimeerit (Alarmo & Kallioniemi 2010, Bragdon ym. 2011).

Prodomeenin katkaisun jälkeen se eritetään solusta yhdessä matuuriproteiinin kanssa ei-kovalenttisesti kiinnittyneenä. Prodomeenin on ajateltu säätelevän proteiinin aktiivisuutta ja saatavuutta (Alarmo & Kallioniemi, 2010). Erityksen jälkeen kompleksi sitoutuu soluvälineaineen komponentteihin, erityisesti mikrofibrilleihin. Tämä kiinnittää erittyneet kasvutekijät erittävän solun lähelle. Vielä ei tiedetä mitä prodomeenin irroittaminen varsinaisesta proteiinista vaatii, sillä sekä prodomeenin kanssa, että ilman sitä olevat BMP-proteiinit tuottavat samanlaisen signaalin reseptoriin sitoutuessaan (Bragdon ym. 2011).

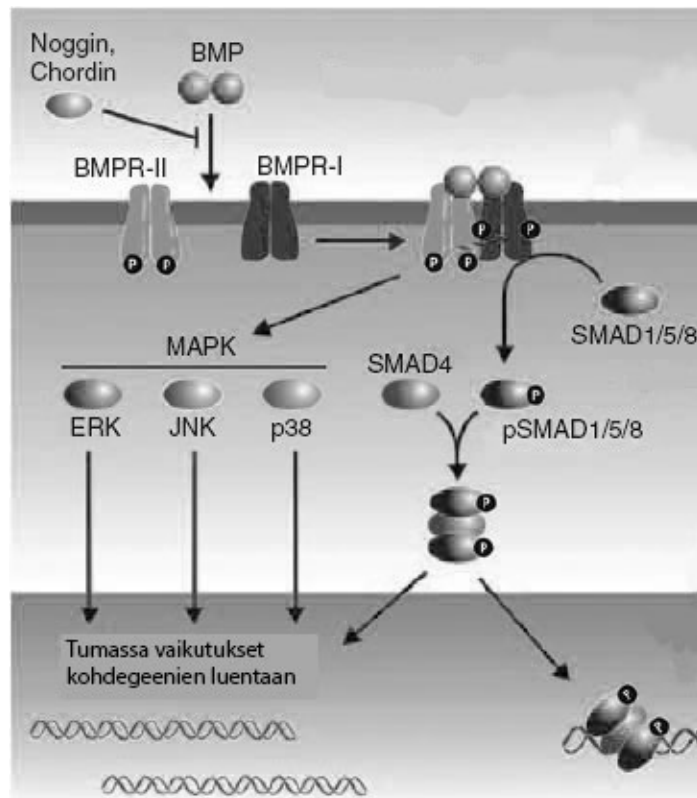
BMP-proteiineille on ainutlaatuista niiden kyky stimuloida luun muodostumista. Ne stimuloivat mesenkymaalisten solujen erilaistumista kondroblasteiksi ja osteoblasteiksi ja toimivat embryogeenesis aikaisessa luun muodostuksessa ja luunkorvautumistapahtumissa aikuisilla. Eri ligandit eroavat toisistaan suuresti osteogeenisessä aktiivisuudessaan ja kaikki eivät edes ole luonnostaan osteoinduktiivisia (Boden 2005, Alarmo & Kallioniemi 2010). Osteoinduktiivisuuden lisäksi BMP:t toimivat monissa alkionkehityksen vaiheissa. Ne säätelevät embryogeenesis varhaisimpia vaiheita, vasen-oikea-symmetrian syntymistä, hermoston ja luurangon muodostumista, raajojen muodostumista ja organogeneesiä. *Bmp2* ja *Bmp4*-nollamutanttihiiret kuolevat alkionkehityksen aikana ja *Bmp7*-nollamutaatiohiiret pian syntymän jälkeen, mikä viittaa proteiinien tärkeyteen luonteeseen (Alarmo & Kallioniemi 2010, Bragdon ym. 2011).

BMP-proteiinien merkittävä rooli tärkeissä alkionkehityksen ja solujen vitalitoimintojen prosesseissa on tehnyt niistä tärkeän ja kiinnostavan tutkimuskohteen. Viime aikoina BMP:t on yhdistetty myös syövän patogeneesiin, edistymiseen ja syöpäalittiuteen. Monissa syövissä BMP-proteiineja ekspressoitaaankin laajalti ja niiden BMP-signaaloinnin häiritseminen johtaa syöpäsolujen fenotyyppien muutoksiin (Singh & Morris 2010, Kallioniemi 2012). Melko varmaa kuitenkin on, että BMP-ligandit ja niihin liittyvät reseptorit vaikuttavat sekä syövän estoon että sen edistymiseen. Samanlaista dualistista roolia on havaittu myös TGF- β -proteiinilla, jonka tiedetään inhiboivan syövän ensivaiheita, mutta myöhemmin stimuloivan etäpesäkkeiden syntyä. Erityisesti BMP-ligandeilla BMP2 ja BMP7 on tehty tutkimuksia, mutta viime aikoina uutta tietoa on tullut myös BMP4:sta (Kallioniemi A. 2012).

BMP2- ja BMP7-proteiineja käytetään tällä hetkellä luunmurtumien hoidossa. Oikein käytettynä BMP:t ovat turvallisia lääketieteen sovelluksissa. Tällä hetkellä ainoat tunnetut riskit liittyvät BMP-proteiineja vastaan syntyviin vasta-aineisiin, joita syntyy noin 5–10 %:lla hoidetuista potilaista. Vaikka syöpäriskin kasvamisesta ei olekaan viitteitä, hoitoa ei suositella potilaille, joilla on ollut syöpä aikaisemmin (Boden 2005, Alarmo ym. 2013).

1.5.2. Signaalointireitit

Liukoiset BMP-proteiinit välittävät vaikutuksensa soluun tyyppien I ja II seriini/treoniinikinaasi-reseptorien kautta. Reseptorit koostuvat lyhyestä solunulkoisesta domeenista, lyhyestä solukalvon läpäisevästä osasta ja solunsisäisestä seriini/treoniinikinaasidomeenista (Goumans & Mummery 2000, Bragdon ym. 2011). Ligandista riippuen, se voi sitoutua ensin joko tyyppin I tai tyyppin II reseptoriin, jonka jälkeen aktivoitunut reseptorityyppi fosforyloi ja täten aktivoi toisen tyyppin reseptorin (Alarmo & Kallioniemi 2010). BMP-proteiinit voivat sitoutua kolmeen eri tyyppin I reseptoriin: BMPR1A (ALK3), BMPR1B (ALK6) ja ACVR1A (ALK2) ja kolmeen tyyppin II reseptoriin: BMPR2, ACVR2A (ActR-II) ja ACVR2B (ActR-IIB). Erilaiset BMP:t sitoutuvat kolmeen tyyppin I reseptoriin erilaisilla affiniteeteilla (Alarmo & Kallioniemi 2010, Singh & Morris 2010). Ligandin sitoutumisen jälkeen aktivoitunut reseptoridimeeri välittää signaalin eteenpäin fosforyloimalla Smad-proteiiniperheen jäsenen. BMP-reseptoreille spesifisiä Smad-proteiineja ovat Smad1, Smad5 ja Smad8 (Goumans & Mummery 2000, Moustakas ym. 2001). Aktivoitunut R-Smad (*Receptor-regulated Smad*) muodostaa kompleksin Smad4:n kanssa, kompleksi liikkuu tumaan ja säätelee siellä kohdegeenien transkriptiota sitoutumalla kohdegeenien voimistajan tai promoottorin nk. SBE- tai BRE-alueelle (*Smad Binding Element* ja *BMP Response Element*) (Goumans & Mummery 2000, Kallioniemi 2012, Owens ym. 2013). Smad-reitin lisäksi BMP:t voivat käynnistää signaloinnin myös ERK1/2:ssa, p38:ssa ja JNK-reitissä. Eri reittien lisäksi signaalointireittien välistä vuoropuhelua on osoitettu muun muassa Smad-reitin ja JAK/STAT, Notch- ja Wnt/beta-kateniini-reittien välillä (Alarmo & Kallioniemi 2010, Kallioniemi 2012, Ehata ym. 2013). BMP-proteiineihin liittyvät signaalointireitit on havainnollistettu kuvassa 1.



Kuva 1. Solun signalointireittien aktivoituminen BMP-ligandin läsnä ollessa. Muokattu lähteestä (Anderson & Darshan 2008).

BMP-signaalointia säädellään soluissa monella eri tavalla tarkan ja oikeanlaisen vasteen saavuttamiseksi antagonistein, reseptoreja säätelemällä ja solun sisäisin tapahtumin. Antagonistit voivat sitoutua joko BMP-ligandiin tai reseptoriin estääkseen ligandin aiheuttaman reseptoriaktivaation (Bragdon ym. 2011, Owens ym. 2013). Monet antagonisteista inhiboivat useamman eri BMP-proteiinin vaikutuksia. Tunnistettuja antagonisteja ovat muun muassa follistatiini, noggin, chordin-perheen jäsenet ja DAN-perheen jäsenet (Bragdon ym. 2011, Kallioniemi 2012). Monet antagonistit ovat BMP-kohdegeenejä, joten näiden kahden toimijan välille muodostuu palauterengas (Alarmo & Kallioniemi 2010).

BMP-signaalointia säädellään myös reseptorien avulla ja monissa syövässä havaitaankin BMP-reseptorien yliekspressiota. Kun reseptoreja ilmennetään tavallista enemmän, reseptorit saattavat mahdollistaa useampien ligandien sitoutumisen reseptoriin ja aiheuttaa lisääntyntä signalointia. Eri BMP-reseptorit ilmenevät myös vasteena tiettyihin hormoneihin, kuten BMPR1B androgeeniin eturauhassyöpäsoluissa (Singh & Morris 2010). Rintasyövässä on havaittu myös BMPR1B yliekspressiota ja se on yhdistetty huonoon ennusteeseen (Alarmo & Kallioniemi 2010). Myös haimasyövässä on havaittu BMP-spesifisten reseptorien yliekspressoitumista (Gordon ym. 2009).

Solun sisällä BMP-proteiinien toimintaa säätelevät inhibitoriset I-Smadit ja SMURF-ubikitiiniligaasit. Inhibitorisiin Smadeihin kuuluvat Smad6 ja Smad7. Smad7 inhiboi sekä TGF- β - ja BMP-signaalointia, kun taas Smad6 inhiboi pääasiassa vain BMP-reittiä (Goumans & Mummery 2000, Ehata ym. 2013). Inhibitoriset Smadit voivat sitoutua joko reseptoriin tai Smad4-proteiiniin ja täten estää Smad-reitin aktivoitumisen. Kilpailevan inhibition lisäksi Smad7 ja Smad6 säätelevät myös TGF- β - ja BMP-reseptorien ubikitinylaatiota ja täten reitin signaloinnin voimakkuutta (Massague ym. 2005). Myös I-Smadit ovat BMP-kohdegeenejä ja luovat palauterenkaan signaloinnille. Lisäksi solussa esiintyvät SMURF1 ja SMURF2 ohjaavat R-Smadeja hajotukseen ja inhiboivat täten BMP-signaalointia. SMURF1 ohjaa myös BMP-reseptoreja hajotukseen yhdessä I-Smadien kanssa (Massague ym. 2005, Alarmo & Kallioniemi 2010). Joissain tapauksissa Smadeja voidaan sumoyloida. Sumoylaatio voi estää ubikitinylaation ja täten pidentää Smad4-R-Smad-kompleksin puoliintumisaikaa mahdollistaen voimakkaamman kohdegeeniin sitoutumisen (Massague ym. 2005). BMP-ligandien vaikutuksia säädellään myös muokkaamalla esimerkiksi BMP7 ja BMP4 jo Golgin laitteessa CRIM1-proteiinin avulla ja tuottamalla pseudoreseptori BAMBIa. Tunnetaan myös muutamia membraaniin sitoutuvia peptidejä, jotka voivat vahvistaa BMP-signaalointia, kuten DRAGON ja RGMA ja avustajareseptoreja, kuten endoglin ja betaglykaani (Alarmo & Kallioniemi, 2010).

BMP-proteiinien kohdegeenejä on tunnistettu monista solutyypeistä ja näistä *Id*-geenit ovat tunnetuimpia. On havaittu, että BMP-proteiinit voivat vaikuttaa jopa tuhansien erilaisten geenien ekspressiotasoihin. *Id*-geenien lisäksi esimerkiksi Wnt-reitin induktioon tarvittavia geenejä on havaittu ekspressoitavan vasteena BMP-proteiineille. Monet aktivoituvista geeneistä liittyvät mm. apoptoosiin, kudosten kasvuun ja erilaistumiseen ja esimerkiksi solun tukirangan säätelyyn (Kallioniemi A. 2012). Smadeilla yksistään on kuitenkin melko huono kyky kiinnittyä DNA:han ja suuren affiniteetin ja kohdegeenispesifisyyden saavuttamiseksi monet kofaktorit ja korepressorit toimivatkin yhdessä Smadien kanssa (Massague ym. 2005, Kallioniemi 2012). Transkriptiotekijät, jotka sitoutuvat sopiviin promoottoreihin voivat joko repressoida tai aktivoida geenien transkriptiota. Esimerkkejä tällaisista transkriptiotekijöistä ovat esimerkiksi Runx-perheen transkriptiotekijät, Menin, sinkkisormiproteiinit OAZ ja YY1 ja oestrogeenireseptori. Lisäksi monet tuman koaktivaattorit kuten p300/CBP ja GCN5, ja korepressorit, kuten c-Ski, Sno, SIP1, lisäävät ja tarkentavat syntyvää vastetta geenin luennassa (Alarmo & Kallioniemi 2010, Ehata ym. 2013). Smad-reitin aktivoitumisen on havaittu indusoivan myös sykliniriippuvaisten kinaasi-inhibiittorien kuten p21 ja p15^{Ink4B} ilmentymistä. Erityisesti BMP-spesifisen Smad1/5/8 aktivaation on havaittu tuottavan vahvan aktivaation p21-promoottorissa. p21 havaittiin alun perin kasvunpysähtymisen

välittäjänä p53:n indusoimana ja sen havaittiin myös vaikuttavan suoraan sykliiniriippuvaisten kinaasien (CDK) aktiivisuuteen. p21:n teho CDK-inhibiittorina perustuu solussa olevien proteiinitasojen säätelyyn transkriptionaalisilla ja post-transkriptionaalisilla mekanismeilla sekä CDK-komplekseista vapautuvien proteiinien määrään (Pouliot & Labrie 2002, Pardali ym. 2005).

1.6. BMP:t syöissä

BMP-proteiineilla on tärkeä merkitys mm. alkionkehityksessä mutta varsinkin viime aikoina ne on yhdistetty myös monien syöpien kehittymiseen. BMP-proteiinien ilmentymistä ja vaikutuksia onkin tutkittu monien syöpien ja normaalikudosten yhteydessä. Monet normaalikudokset ilmentävät eri BMP-ligandeja, sillä kyseisissä kudoksissa kasvutekijöitä tarvitaan esimerkiksi homeostaasin tai kehittymisen aikana. Monissa syöissä taas ilmennetään tiettyjä BMP-ligandeja yleensä enemmän kuin normaalikudoksessa, mikä saattaa johtua esimerkiksi BMP-geenin monistumasta tai proteiinin aiheuttaman palauterenkaan toimimattomuudesta. Lisäksi esimerkiksi solujen viljelyolosuhteet, kudoksen arkkitehtuuri ja syöpäkudoksen asteisuus voivat vaikuttaa BMP-ligandien ekspressoitumiseen, kuten on osoitettu esimerkiksi munuaissyövässä, maksasyövässä ja keuhkosityövässä (Singh & Morris 2010). Tässä kappaleessa käsitellään BMP-proteiinien ilmentymistä ja vaikutuksia tiettyihin syöpätyyppeihin esimerkkitapausten avulla. Taulukossa 1 esitellään BMP-proteiinien ilmentyminen ja vaikutukset syöpäsolujen kasvuun tutkituimmissa syöpätyypeissä.

Taulukko 1. Luun morfogeneettisten proteiinien esiintyminen ja vaikutukset erilaisiin syöpätyyppeihin. + merkitsee lisääntynyttä ominaisuutta, - vähentynyttä ominaisuutta ja 0 yhtäsuurta ominaisuutta normaalisoluihin verrattuna.

Syöpä	BMP	Ilmentyminen	Kasvu	Invaasio/migraatio	Lähde
Aivokasvaimet	BMP4		-		(Piccirillo ym. 2006, Chirasani ym. 2010, Duggal ym. 2013)
	BMP7		-		
Prolaktinooma	BMP4	+	+		(Paez-Pereda ym. 2003)
Pään ja kaulan syövät	BMP4	+		+	(Xu ym. 2011)
Retinoblastooma	BMP4	-	0		(Haubold ym. 2010)
Munasarjasyöpä	BMP2	+			(Shepherd & Nachtigal 2003, Le Page ym. 2006, Theriault ym. 2007, Herrera ym. 2009)
	BMP4	0	-	+	
	BMP9	+		+	
Eturauhassyöpä	BMP2	+	+	+	(Harris ym. 1994, Haudenschield ym. 2004, Feeley ym. 2006)
	BMP3	+			
	BMP4	0	0	+	
	BMP6	+	-		
	BMP7		0	0	

Rintasyöpä	BMP2	-	+/-	+	(Alarmo ym. 2007, Hanavadi ym. 2007, Alarmo ym. 2009, Ketolainen ym. 2010, Guo ym. 2012)
	BMP3	+			
	BMP4	0/+	-	+/-	
	BMP5	+			
	BMP6	-			
	BMP7	+	+/-	+/-	
	BMP8	+			
	GDF9a	+		-	
	BMP15	+		-	
Maksasyöpä	BMP2	0			(Maegdefrau ym. 2009, Maegdefrau & Bosserhoff 2012)
	BMP3	0			
	BMP4	+		+	
	BMP5	0			
	BMP6	+			
	BMP7	+			
	BMP8	+			
	BMP9	+			
	BMP10	+			
	BMP11	+			
	BMP12	0			
	BMP13	+			
	BMP14	0			
	BMP15	+			
Haimasyöpä	BMP2	0/+	+/-	+	(Gordon ym. 2009, Virtanen ym. 2011)
	BMP3	0			
	BMP4	+	-	+	
	BMP5	-	-	+	
	BMP6	0			
	BMP7	0		+	
	BMP8	-			
Keuhkasyöpä	BMP2	+	+	+	(Langenfeld ym. 2003, Bieniasz ym. 2009)
	BMP4	+			
Vatsasyöpä	BMP2		-		(Shirai ym. 2011, Zhang ym. 2012)
	BMP4		-		
Paksusuolen syöpä	BMP2		-		(Beck ym. 2007, Hardwick 2008)
	BMP3		-		
	BMP4	+			
	BMP7	+	-		
Myelooma	BMP2		-		(Kawamura ym. 2002, Ro ym. 2004)
	BMP4		-		
	BMP5		-		
	BMP6		-		
	BMP7		-		
Virtsarakon syöpä	BMP2	+			(Hung ym. 2008)
Melanooma	BMP2	+			(Rothhammer ym. 2005, Hsu ym. 2005)
	BMP3	0		+	
	BMP4	+			
	BMP5	0			
	BMP6	+			
	BMP7	+		-	

	BMP8	+	
Basaalisolukarsinooma	BMP2	0	(Sneddon ym. 2006)
	BMP4	0	-

Ruuansulatuskanavan alueella paksusuolen syövässä on havaittu esimerkiksi BMP4- ja BMP7-proteiinien yliekspressiota, kun taas BMP-ligandien -2,-3 ja -7 tiedetään estävän kyseisen syöpätyypin solujen kasvua (Beck ym. 2007, Hardwick 2008). Vatsasyövässä tiedetään ekspressoitavan laajalti esimerkiksi BMP2- ja BMP4-ligandeja ja samojen proteiinien on havaittu myös vähentävän vatsasyöpäsolujen kasvua (Shirai ym. 2011). Ruokatorven syövässä on havaittu esimerkiksi BMP6-ylieksspressiota (Singh & Morris 2010). Lisäksi BMP-signaaloinnin on havaittu olevan suuressa roolissa juveniilin polypoosisyndrooman synnyssä, sillä noin puolessa potilasnäytteissä on havaittu mutaatioita Smad4- ja BMPR1A-proteiineja koodaavissa geeneissä (Ehata ym. 2013). Alarmo ym. (2013) tutkimuksessa selvisi, että BMP4:ää ilmennetään normaalissa vatsan ja ruokatorven kudoksessa, mutta ei muualla ruuansulatuskanavan alueella.

Normaalissa keskushermoston kudoksessa tiedetään ekspressoituvan suuri osa tähän mennessä tunnistetuista BMP-perheen proteiineista (Bragdon ym. 2011). Alueen syövässä, kuten esimerkiksi prolaktinoomissa eli aivolisäkkeen kasvaimissa BMP4-ligandin on havaittu yliekspressoituvan (Paez-Pereda ym. 2003) ja erityyppisissä aivokasvaimissa ainakin BMP4- ja BMP7-ligandien tiedetään vähentävän syövän kantasolujen kasvua (Piccirillo ym. 2006, Chirasani ym. 2010, Duggal ym. 2013).

Ihmisen lisääntymiseen liittyvissä normaalikudoksissa kuten munasarjoissa, kohdussa ja eturauhasessa tiedetään ekspressoitavan laajalti monia BMP-ligandeja (Bragdon ym. 2011). Alarmo ym. (2013) havaitsivat BMP4-ekspressiota esimerkiksi kohdunkaulan, munasarjojen ja kivesten normaaleista kudoksenäytteistä. Vastaavien alueiden syöpänäytteissä ligandin ekspressiotaso oli pääasiassa vähäisestä vahvaan granulaariseen ekspressioon (Alarmo ym. 2013). Munasarjasyövässä on havaittu myös esimerkiksi BMP2- ja BMP9-ylieksspressiota ja tutkimuksista on selvinnyt että BMP4 ja -9 lisäävät munasarjasyöpäsolujen migraatiota ja invaasiota (Theriault ym. 2007, Herrera ym. 2009). Eturauhassyöpä on yleinen syöpätyyppi miehillä ja sen yhteydessä on tutkittu monien BMP-ligandien ekspressiota. Esimerkiksi BMP2, -3 ja -6 tiedetään yliekspressoituvan eturauhassyöpäsoluissa ja BMP2:n tiedetään lisäävän eturauhassyöpäsolujen kasvua, invaasiota ja migraatiota (Feeley ym. 2006). Lisäksi eturauhassyövässä BMP-proteiineista vastaavien geenien *BMP2*, -5 ja -7 on havaittu monistuneen jopa yli puolessa potilasnäytteistä (Singh & Morris 2010).

Maksan, haiman ja keuhkojen normaalikudoksissa ekspressoitetaan esimerkiksi BMP1, BMP6 ja BMP10-proteiineja ja BMP-perheen jäsenillä tiedetäänkin olevan tärkeä merkitys

alkionkehityksessä organogeneesin aikana (Bragdon ym. 2011). Hepatosellulaarisyövän yhteydessä on havaittu monien BMP-proteiinien yliekspressiota, mutta niiden merkitystä syövän synnylle tai syöpäsolujen kasvulle ei vielä tunneta hyvin. Ainakin BMP4:n on kuitenkin havaittu lisäävän maksasyöpäsolujen kasvua (Maegdefrau ym. 2009, Maegdefrau & Bosserhoff 2012). Haimasyövässä tiedetään yliekspressoitavan BMP4 ja -5-ligandeja ja ali-ilmennettävän BMP8-ligandia. Sekä BMP4 että -5 vähentävät haimasyöpäsolujen kasvua ja BMP4 lisää solujen invaasiota, migraatiota ja epiteelimesenkymaalimuutosta (Hamada ym. 2007, Virtanen ym. 2011). Haimasyöpäsoluissa on havaittu myös ilmentettävän normaalikudosta vähemmän BMP-spesifisiä reseptoreita (Virtanen ym. 2011). Normaalisissa keuhkokudoksissa ilmentetään runsaasti BMP4-ligandia ja keuhkocyövässä samaa ligandia tiedetään yliekspressoitavan (Alarmo ym. 2013). Lisäksi esimerkiksi BMP2:n on havaittu lisäävän keuhkocyöpäsolujen kasvua ja migraatiota (Langenfeld ym. 2003, Bieniasz ym. 2009).

Rintasyöpäkudoksien BMP-proteiiniekkspressiota on tutkittu runsaasti ja on havaittu, että esimerkiksi BMP3, -7 ja -8 yliekspressoituvat monissa rintasyöväissä, kun taas BMP2 ja -6 ilmenevät normaalikudosta alemmalla tasolla (Alarmo ym. 2007, Alarmo & Kallioniemi 2010). Guo ym. (2012) tutkimuksessa havaittiin, että rintasyöpäsolut ekspressoivat laajalti lähes kaikkia tutkimuksessa mukana olleita BMP-proteiineja, mutta erityisesti BMP2, -4, -7 ja -11. Esimerkiksi BMP7:llä on todettu olevan rintasyöpäsolulinjasta riippuen joko kasvua, migraatiota ja invaasiota lisäävä tai vähentävä vaikutus (Alarmo ym. 2009). Lisäksi BMP7-geenin tiedetään monistuneen rintasyöväissä (Singh & Morris 2010). Paljoakaan ei vielä tiedetä BMP-proteiinien osuudesta rinnan kehittämisessä, mutta koska kehittyvässä rintakudoksessa tiedetään ekspressoituvan BMP-reseptoreja, voidaan siellä olettaa tapahtuvan jonkinlaista BMP-signaalointia. Kuitenkin vain Bmp2:n ja Bmp4:n on ehdotettu säätelevän hiiren rintarauhasen kehittymistä (Alarmo & Kallioniemi, 2010).

Myeloomassa eli plasmasyövässä monien BMP-proteiinien on havaittu vähentävän myeloomasyöväsolujen kasvua mutta niiden ekspressiotasoa normaalissa ja syöpäkudoksessa ei vielä tunneta (Kawamura ym. 2002, Ro ym. 2004). Melanoomassa on havaittu lisääntyntä ilmentymistä muun muassa BMP2, -6 ja -7-proteiinien osalta mutta tietoa niiden vaikutuksesta esimerkiksi syöpäsolujen kasvuun on vähän (Rothhammer ym. 2005, Hsu ym. 2005).

Monet BMP-proteiineista ovat yleisesti siis solujen kasvua vähentäviä mutta joissain syöpätyypeissä nämä kasvutekijät saattavat myös lisätä solujen kasvua ja invaasiokykyä. Monissa tapauksissa BMP-proteiinien kasvua vähentävä vaikutuksen on todettu johtuvan solujen solusyklin

pysähtymisestä G1-vaiheeseen ja sykliiniriippuvaisten kinaasi-inhibiittorien p21:n ja p15:n toiminnasta (Pardali ym. 2005, Singh & Morris 2010).

1.7. BMP4 rinta- ja haimasyövissä

Monet tutkimukset, joilla on pyritty selvittämään BMP4:n roolia syövän kehittämisessä ja kasvussa, on tehty *in vitro*-tutkimuksina. BMP4:sta on annettu joko kasvatusmediumin lisänä tai soluihin on lisätty ekspressiovektori, joka joko hiljentää tai voimistaa geenin lukua. Myös BMP-antagonistien ekspressiotasojen muuntelua on testattu. Suurimmassa osassa syöpäsolulinjoja BMP4-käsittely aiheuttaa solujen kasvun hidastumista, mutta myös kasvun nopeutumista tai vaikutuksen puuttumista on raportoitu. Syöpätyyppikohtaisesti BMP4 voi myös vaikuttaa syöpäsolujen apoptoosiherkkyyteen esimerkiksi Bax, Bcl-2 ja Bcl-2-proteiinien välityksellä (Kallioniemi A. 2012). BMP4:lla tiedetään olevan vaikutuksia myös kantasolujen erilaistumiseen ja endoteelisolujen putken muodostuskykyyn (Kallioniemi 2012, Tsuchida ym. 2013). Olemassa olevan tiedon mukaan BMP4 tukee myös angiogeneesiä, prosessia joka on elintärkeä vaihe syöpäkasvaimen kasvussa. BMP4:n angiogeeniset tehtävät välittyvät pääasiallisesti Smad-reitin kautta mutta myös ERK- ja p38-reittien aktivaatiota on havaittu (Singh & Morris 2010, Kallioniemi 2012).

BMP4:ää ekspressoidaan ihmisen luuytimessä, munuaisissa, pernassa, aivoissa, keuhkoissa, eturauhasessa, haimassa ja muun muassa luurankolihaksessa. Se sijaitsee kromosomissa 14 lokuksessa q22-q23. Ihmisellä sen tiedetään vaikuttavan luurangon regeneraatioon ja munuaisten muodostumiseen (Bragdon ym. 2011, Alarmo ym. 2013). Lisäksi BMP4:n tiedetään olevan elintärkeä alkionkehitykselle, sillä *Bmp4*-nolladeleetiohiirenalkiot kuolevat viimeistään 9,5 päivän iässä (Kallioniemi 2012, Alarmo ym. 2013).

Luun morfogeneettisen proteiini 4:n toimintaa on tutkittu laajalti myös rinta- ja haimasyöpien yhteydessä. Normaalissa rintakudoksessa ilmennetään laajalti BMP4-ligandia, mutta yhtäsuurissa määrin ligandi ilmenee myös kasvainkudoksessa (Singh & Morris 2010, Ketolainen ym. 2010, Guo ym. 2012). Alarmo ym. tutkimuksessa BMP4-proteiiniekspressiota havaittiin 66 % rintasyöpäkasvainnäytteissä ja erityisen vahvaa granulaarista värjäytymistä useammin lobulaarikarsinoomissa kuin duktaalikarsinoomissa. Lisäksi granulaaristen värjäytymien kasvaimet olivat potilastietojen mukaan hitaampia kasvamaan kuin ei-granulaariset kasvaimet. Kudoksenäytteistä selvisi myös, että kasvaimet, joissa nähtiin granulaarinen värjäytyminen lähettivät etäpesäkkeitä ei-granulaarisia enemmän ja erityisesti luuhun (Alarmo ym. 2013). Myös Guo ym. (2012) tutkimuksessa todettiin, että BMP4:n ekspressio oli vahvinta metastaattisissa

rintasyöpäsolulinjoissa. Haimasyövän osalta on myös tutkimusta BMP4-proteiinin vaikutuksista. Monien tutkittujen solulinjojen on havaittu yliekspressoivan BMP4-ligandia sekä ekspressoivan sen vasteisiin liittyviä BMP-reseptoreja ja Smad-proteiineja. Tasojen on kuitenkin voitu havaita olevan solulinjaspesifisiä (Gordon ym. 2009, Virtanen ym. 2011). Eri BMP-reseptorien ilmenemistasojen on havaittu vaihtelevan eri haimasyöpäsolulinjojen välillä, mutta yleisesti niiden taso on havaittu olevan normaalikudosta pienempi (Virtanen ym. 2011).

BMP4-käsittelyn tai yliekspression on havaittu vähentävän rintasyöpäsolujen kasvua, mutta samalla sen on havaittu myös lisäävän joidenkin solutyypin migraatiota ja invaasiota (Ketolainen ym. 2010, Guo ym. 2012). Tutkittujen solulinjojen kasvun hidastumisen syyksi havaittiin solujen solusyklin pysähtyminen G1-vaiheeseen. Lisäksi rintasyöpäsolulinjoissa on havaittu Smad-reitin aktivoituminen, mutta ei ERK 1/2 tai p38-reittien aktivaatiota (Ketolainen ym. 2010).

Aikaisemmissa tutkimuksissa on myös todettu, että rintasyöpäsolujen kasvun hidastumiseen BMP4-käsittelyn seurauksena liittyy p21-induktio solulinjaspesifisesti (Ampuja ym. 2013). Guo ym. (2012) tutkivat rintasyöpäsoluissa BMP4-vasteeseen liittyvien, syöpään jo aikaisemmin liitettyjen geenien ilmentymistä ja havaitsivat MMP-1:n ja CXCR4:n ekspression lisääntyvän BMP4:tä yliekspressoivissa soluissa sekä proteiini- että mRNA-tasolla. Matriksin metalloproteinaasit (MMP) ovat sinkkiriippuvaisia endoproteaaseja, jotka toimivat muun muassa luiden kehityksessä, verisuoniston muuntumisessa ja kudosten homeostaasissa. CXCR4 on tärkeä kemokiinireseptori, joka ekspressoituu laajalti rintasyöpäsoluissa (Guo ym. 2012). BMP4:n vaikutusta rintasyöpäsoluihin on tutkittu myös kolmiulotteisella kasvatusalustalla. Ampuja ym. (2013) tutkivat BMP4:n vaikutusta rintasyöpäsolujen kasvuun kolmiulotteisessa kasvatuksessa Matrigelissä ja polyetyleenigykoli-geelissä ja havaitsivat kasvutekijäkäsittelyn vähentävän solujen kasvua molemmilla alustoilla. Tutkimuksessa huomattiin myös fenotyypin muutos invasiivisessa MDA-MB-231-solulinjassa, mikä saattaa viitata BMP4-käsittelyn lisäävän tämän solulinjan migraatiokykyä. Tähtimäisen fenotyypin havaittiin riippuvan matriksin metalloproteinaaseista. Myös kolmiulotteisessa kasvatuksessa on havaittu solujen kasvun hidastumisen liittyvän p21-induktioon osalla solutyypeistä (Ampuja ym. 2013).

BMP4-käsittely vähentää haimasyöpäsolujen kasvua selvästi myös soluissa, joissa Smad-reitti on puutteellinen. Solujen kasvun on havaittu johtuvan pysähtymisestä G1-vaiheeseen ja solulinjaspesifisesti myös apoptoosin lisääntymisestä (Virtanen ym. 2011). BMP4-käsittely vaikuttaa myös lisäävästi haimasyöpäsolujen invaasio- ja migraatiokykyyn (Hamada ym. 2007, Gordon ym. 2009, Virtanen ym. 2011). Haimasyöpäsoluissa BMP4:n on havaittu aktivoivan Smad- ja p38-reitit solulinjaspesifisesti (Gordon ym. 2009, Virtanen ym. 2011). Lisäksi

haimasyöpäsoluissa on havaittu BMP-kohdegeenin *Id1*:n ekspression indusoituvan BMP4-käsittelyn jälkeen ja solujen morfologian muutos, joka viittaa epiteeli-mesenkymaalitransitioon BMP4-kasvutekijäkäsittelyn seurauksena (Hamada ym. 2007, Gordon ym. 2009).

Yleisesti BMP4 siis vähentää rinta- ja haimasyöpäsolujen kasvua ja toisaalta samalla se myös lisää monien solulinjojen liikkumiskykyä. BMP4:n vaikutuksen solujen kasvuun riippuvat siitä, minkälaisia vaikutuksia se saa aikaan mm. solusykliissä. Muutamien tutkimusten perusteella BMP4-käsittely saa aikaan soluissa solusyklin pysähtymisen G1-vaiheeseen, CCND1-ekspression vähenemistä ja p16/p21 ekspression lisääntymistä (Virtanen ym. 2011, Kallioniemi 2012, Ampuja ym. 2013). CCND1 on G1-S-siirtymisen päätekijä ja täten sen ekspression vähentyminen estää solujen etenemisen S-vaiheeseen. Kasvun lisääntymisen taas on voitu havaita johtuvan CDK1:n ja CCNB1:n ekspression induktiosta seurauksena ERK/MEK-reitin aktivaatiosta. Sekä CDK1 että CCNB1 ovat myös solusyklin tärkeitä säätelijöitä, joiden tehtävänä on taata solujen siirtyminen M-vaiheeseen (Kallioniemi 2012).

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena on syventää nykyistä tietämystä BMP4-kasvutekijän vaikutuksista rintaja haimasyöpäsoluihin. Tutkimus perustuu professori Anne Kallioniemen ryhmän aikaisempiin tutkimuksiin ja niistä saatuihin tuloksiin. Työssä käytetään syöpäsolujen kasvualustana luonnollista alkuperää olevaa Matrigeliä, sillä kuten edellä on esitetty, tämän materiaalin katsotaan muistuttavan solujen luonnollista kasvuympäristöä synteettisiä geelejä enemmän. Lisäksi normaalien rintasolujen on havaittu muodostavan luonnollisia rauhasia muistuttavia rakenteita Matrigelissä. Tutkimuksessa varmistetaan Anne Kallioniemen ryhmän aikaisempia tuloksia erityisesti rintasyöpäsolujen osalta, mutta vertailukelpoisten tulosten saavuttamiseksi tämä on tarpeellista. Pääpaino tutkimuksessa on kuitenkin BMP4:n vaikutusten tutkiminen haimasyöpäsoluissa, sekä siinä sopiiko Matrigel kasvatusalustana rintasyöpäsolujen lisäksi myös haimasyöpäsoluille. Molemmissa syöpätyypeissä käytettiin syöpäsolujen lisäksi myös normaaleja, kuolemattomaksi muunnettuja solulinjoja näiden toimintojen ja mahdollisten erojen vertaamiseksi.

3. Materiaalit ja menetelmät

Työssä käytettiin kolmiulotteista kasvatusalustaa perinteisen kaksiulotteisen kasvatusalustan sijaan. Solujen kasvua seurattiin fluorometrisin menetelmin ja solujen morfologiaa mikroskoopin ja tietokoneen avulla. Solujen tuottamia proteiineja analysoitiin Western Blot-menetelmällä ja immunofluoresenssivärjäyksin.

3.1. Solulinjat ja niiden kasvatus

Työssä käytettiin yhteensä seitsemää eri solulinjaa: kuolemattomaksi muunnettuja normaaleja ihmisen rinnan epiteelisoluja (MCF-10A) ja kolmea rintasyöpäsolulinjaa (T-47D, BT-474 ja MDA-MB-231) sekä kuolemattomaksi tehtyä ihmisen haimasolulinjaa (hTERT-HPNE) ja kahta haimasyöpäsolulinjaa (MIA PaCa-2 ja PANC-1). Kaikki solulinjat hankittiin American Type Culture Collectionista (Manassas, VA, USA) ja niitä kasvatettiin +37 °C:ssä 5 % CO₂-pitoisuudessa, ellei muuta erikseen mainita.

MCF-10A-solujen kasvatusliuos sisälsi DMEM-kasvatusliuosta (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*) ja Hams F12-kasvatusliuosta 1:1. Perusliuokseen lisättiin 5 % hevosen seerumia, 100 µg/ml epidermaalista kasvutekijää (EGF), 1 mg/ml hydrokortisonia, 1 mg/ml koleratoksiinia, 10 mg/ml insuliinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Kaikki ainesosat hankittiin Sigma-Aldrichilta (St.Louis, MO, USA). Kolmiulotteisessa kasvatuksessa käytettiin kasvatusmediumia, jossa oli pienempi pitoisuus hevosen seerumia (4 %) ja suurempi pitoisuus epidermaalista kasvutekijää (5 ng/ml) kuin tavallisessa kasvatusmediumissa (Debnath ym. 2003).

T-47D-solujen kasvatusliuos sisälsi RPMI 1640-kasvatusliuosta, 10 % naudan sikiön seerumia, 0,2 IU/ml insuliinia, 2mM glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100µg/ml streptomysiiniä. Kaikki ainesosat hankittiin Sigma-Aldrichilta.

BT-474-solujen kasvatusliuos sisälsi DMEMiä, 10 % naudan sikiön seerumia, 2mM glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100µg/ml streptomysiiniä. Kaikki ainesosat hankittiin Sigma-Aldrichilta.

MDA-MB-231-solujen kasvatusliuos sisälsi L15-kasvatusliuosta, 10 % naudan sikiön seerumia, 2mM glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100µg/ml streptomysiiniä. Kolmiulotteisessa kasvatuksessa käytettiin vastaavaa kasvatusliuosta, mutta L15-kasvatusliuos korvattiin DMEM-

liuoksella. Ylläpidossa soluja kasvatettiin ilman hiilidioksidia suljetussa soluviljelypullossa. Kaikki ainesosat hankittiin Sigma-Aldrichilta.

hTERT-HPNE-solujen kasvatusliuos sisälsi DMEMiä ja M3Base-kasvatusliuosta suhteessa 3:1. Peruspohjaan lisättiin 5 % naudan sikiön seerumia, 2 mM glutamiinia, 10 µg/ml epidermaalista kasvutekijää, 1g/l glukosia, 750 ng/ml puromysiiniä, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. M3Base-kasvatusliuos hankittiin InCell:ltä (San Antonio, TX, USA) ja muut Sigma-Aldrichilta

PANC-1-soluja kasvatettiin DMEM-pohjaisessa kasvatusliuoksessa, johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia, 2 mM glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Kaikki ainesosat hankittiin Sigma-Aldrichilta.

MIA PaCa-2-soluja kasvatettiin DMEM-pohjaisessa kasvatusliuoksessa, johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia, 2,5 % hevosen seerumia, 2 mM glutamiinia, 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Kaikki ainesosat hankittiin Sigma-Aldrichilta

3.2. Kolmiulotteinen soluviljely

Kolmiulotteisessa soluviljelyssä käytettiin kasvatusalustana kasvutekijä-vähennettyä Matrigeliä (BD Biosciences, Bedford, USA). Matrigel on hiiren Engelbreth-Holm-Swarm-kasvaimista eristettyä soluväliainetta, joka sisältää runsaasti tyvikalvossa luonnollisesti esiintyviä proteiineja, kuten laminiinia, tyypin IV kollageenia, heparaanisulfaatti-proteoglykaaneja ja entaktiinia. Matrigelissä on myös erilaisia kasvutekijöitä, kuten TGF- β :ta, epidermaalista kasvutekijää, insuliinintapaista kasvutekijää ja fibroblasti-kasvutekijää. Kasvatusalustan yhteydessä käytettiin niin kutsuttua over-lay-menetelmää, jossa solut asetetaan kasvamaan kasvatusalustan pinnalle sen sijaan että ne haudattaisiin kokonaan geelin sisään. Menetelmä säästää materiaalia ja sen on havaittu tuottavan suurempia asinusrakenteita kuin geelin sisään valettujen solujen (Debnath ym. 2003).

Kasvatusalustat valmistettiin valmistajan ohjeen mukaan. Pakastettu geeli sulatettiin jäähauteella ja sekoitettiin huolellisesti. Kylmille soluviljelyalustoille pipetoitiin tasaisesti 160µl Matrigeliä ja geelikerroksen annettiin jähmettyä +37 °C 5 % CO₂ 20–30 min. Päälle pipetoitiin uutena kerroksena 120µl kylmää Matrigeliä ja päällimmäisen kerroksen annettiin jähmettyä samoissa olosuhteissa kuin ensimmäisen kerroksen. Jähmettyneen kasvatusalustan päälle pipetoitiin tutkittavat solut mediuumeissaan, johon oli sekoitettu 2,5 % Matrigeliä (overlay-menetelmä).

MCF-10A soluja käytettiin tutkimuksessa 20 000 solua/ml, T-47D-soluja 20 000solua/ml, BT-474-soluja 60 000solua/ml ja MDA-MB-231-soluja 20 000/ml. hTERT-HPNE-soluja käytettiin 20 000 solua/ml, PANC-1-soluja 20000–30 000 solua/ml ja MIA PaCa-2 soluja 8600–30000/ml. Solujen lukumäärät valittiin solujen kasvuominaisuuksien ja testien perusteella. Solut laskettiin Z1 Coulter Particle Counter:illa (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) tai Bürker-kammiolla (Marienfield). Kasvatusliuksina käytettiin kullekin solulinjalle sopivaa mediumia ja soluja kasvatettiin alustalla 14 vuorokautta.

3.3. BMP4-käsittely

Kolmiulotteisille kasvatusalustoille lisättiin solujen lisäyksen yhteydessä 100 ng/ml ihmisen rekombinantista BMP4-proteiinia (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Proteiini liuotettiin valmistajan ohjeen mukaan kuljetinliuokseen, joka sisälsi 4 mM HCl:a ja 0,1 mg/ml naudan seerumin albumiinia (BSA, Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Kontrollisolut käsiteltiin pelkällä kuljettimella (vehikkeli-käsittely). Tuore kasvatusliuos, johon oli lisätty joko BMP4 tai pelkkä kuljetin, vaihdettiin soluille 1-3 päivän välein. Jokaisessa kokeessa käsittelyt tehtiin vähintään kolmelle rinnakkaiselle näytteelle.

3.4. Solujoukkojen koon, kasvun ja muodon analysointi

Solujen määrää eri käsittelyjen jälkeen mitattiin fluoresenssiin perustuvalla Alamar Blue-menetelmällä (Invitrogen). Alamar Bluen käyttö perustuu sen sisältämän resatsuriinin pelkistymiseen fluoresoivaksi resorufiiniksi. Pelkistymisreaktio tapahtuu elävien solujen mitokondrioissa, joten pelkistetyn muodon määrän voidaan olettaa vastaavan elävien solujen määrää.

Solujen määrää mitattiin lisäämällä kunkin solutyypin kokeessa käytettyyn mediumiin 10 % Alamar Blueta. Soluilla ollut vanha kasvatusliuos poistettiin ja tilalle pipetoitiin Alamar Blue-pitoinen liuos. Liuoksen annettiin olla soluilla 4 tuntia +37 °C, 5 % CO₂, jonka jälkeen vakioitu määrä liuosta otettiin talteen fluoresenssin mittausta varten. Fluoresenssin mittausta suoritettiin eksitaatioaallonpituudella 560 nm ja emissioaallonpituudella 590 nm Tecan Infinite F200 Pro-laitteella (Tecan, Männedorf, Sveitsi). Laitteen ohjelmistona toimi Tecan i-Control 1.7.1.12.

Solujen kasvua ja solujoukkojen morfologiaa tutkittiin Olympus IX71-mikroskoopilla (Olympus, Tokio, Japani) ja kuvattiin QImaging-kameralla QCapture Pro 6.0 -ohjelman avulla (Olympus) Nelinkertaisesti suurennettuja kuvia analysoitiin Image J-ohjelmalla (U.S. National Institutes of

Health, Bethesda, MD, USA). Molemmista käsittelyistä analysoitiin kaksi kuvaa kustakin näytteestä. Kuvista määritettiin solujoukkojen pinta-ala.

3.5. Proteiinien keräys

Kahden viikon kasvatuksen jälkeen soluista kerättiin proteiinit Western Blot-analyysiä varten. Ennen solujen keräämistä niitä käsiteltiin tuoreella BMP4-pitoisella mediumilla kolmen tunnin ajan. Solut irrotettiin Matrigelistä lisäämällä kuopille kylmää 5mM EDTA-PBS-liuosta. Geeli rikottiin pipetoimalla ja sentrifugoitiin solupelletin muodostamiseksi. Pelletti säilöttiin -70 °C tai jatkokäsiteltiin välittömästi. Sulan solupelletin päälle lisättiin RIPA-puskuria, johon oli lisätty proteaasi-(CompleteMini Protease, Roche) ja fosfataasi-inhibiittoreita (PhosphoStop, Roche). Sekoittamisen jälkeen liuos sentrifugoitiin ja supernatantti otettiin talteen proteiinimääryityksiä varten. Proteiininäytteistä mitattiin proteiinikonsentraatiot Bradford-reagenssin (Sigma-Aldrich) ja standardisuoran avulla yllämainitulla Tecan-laitteella.

3.6. Western Blot

Western Blot-menetelmä perustuu tutkituille proteiineille spesifisten vasta-aineiden käyttöön. SDS-PAGE:n aikana kokonsa perusteella geelissä eri kohtiin kulkeutuneet proteiinit siirretään huokoiselle membraanille säilyvyyden parantamiseksi ja tunnistetaan erilaisten vasta-aineiden ja näihin kohdennettuihin havainnoinnin helpottamiseen tarkoitettujen entsyymien avulla.

Soluista eristetyistä proteiininäytteistä otettiin 30-50 µg näytteet Western Blot-analyysiä varten. Näytteet ladattiin SDS-PAGE-geeliin. Geelielektroforeesin jälkeen proteiinit siirrettiin PVDF-membraanille (Roche). Proteiinien tunnistamiseen käytettiin pSMAD1/5/8 (1:1000 laimennos, Cell Signaling, Beverly, MA, USA), p21 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), SMAD5 (1:1000, Cell Signaling) ja α -tubuliini(1:20 000, Roche) primaarivasta-aineita. Käytetyt vasta-aineet olivat jäniksen polyklonaalisia vasta-aineita. Sekundaarivasta-aineena käytettiin BM Chemiluminescence Western Blotting Kit:in (Roche, Mannheim, Saksa) hiiri/jänis-vasta-ainetta 1:5000. Membraanille siirtyneet proteiinit detektoitiin filmille käyttäen Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate:a (Thermo Scientific, IL, USA) valmistajan ohjeen mukaan. Membraanit stripattiin ja koetettiin uudelleen α -tubuliini- tai SMAD5-vasta-aineilla proteiinimäärien yhtäsuuruuksien määrittämiseksi. Filmejä analysoitiin ImageJ-ohjelman avulla.

3.7. PCR

hTERT-HPNE-soluista tutkittiin niiden sisältämien BMP-reseptorien *ACVR2A*, *BMPRIA*, *BMPRI1B*, *ACVR1*, *BMPIR2* ja *ACVR2B* ekspressio kaksikulotteisen kasvatuksen jälkeen. Solut kerättiin tavanomaisen ylläpitojaon yhteydessä ja niitä säilytettiin RLT-puskurissa. Soluista eristettiin totaali-RNA RNEasy Minikit-järjestelmällä (Qiagen, Valencia, CA) ja se käännettiin cDNA:ksi SuperScript III RT-entsyymillä (Invitrogen) avulla. PCR suoritettiin geeneille spesifisten alukkeiden avulla ja PCR-laitteen avulla (MJ Research, PTC-200). PCR-tuotteet analysoitiin AGE-geelissä, jossa latausvärinä käytettiin 6X-DNA Loading Dye:tä (Thermo Scientific) ja kokomarkkerina New England Biolabs:in 50bp DNA-kokomarkkeria. Näytteiden visualisointiin käytettiin SybrSafe-väriä (Invitrogen).

3.8. Immunofluoresenssileimaus

Immunofluoresenssileimaus perustuu elävien solujen kiinnittämiseen nykyiseen tilaansa. Solut värjätään tutkittavaa ainetta vastaan valmistetulla vasta-aineella, jonka tarttuminen kohdemolekyyliinsä visualisoidaan käyttämällä fluoresoivaa vasta-ainetta.

hTERT-HPNE-soluja kasvatettiin Chamber-glass-levyllä (Millicell EZ Slide, Millipore, MA, USA) kolmiulotteista kasvatusalustaa varten 13 vrk (15000 solua/ml) ja käsiteltiin 100 ng/ml BMP4 tai kuljettimella. Kasvatusajan lopuksi solut kiinnitettiin 4 % paraformaldehydillä tunnin ajan ja permeabilisoitiin 0,1 % Triton-X100:lla 45 min ajan. Vasta-aineiden epäspesifisen tarttumisen estämiseksi solut käsiteltiin 3 % BSA:lla (Bovogen, Australia) liuotettuna fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS, Sigma-Aldrich). Samaa BSA-liuosta käytettiin myös vasta-aineiden laimentamiseen. Vasta-aineiden annettiin vaikuttaa 1,5 tunnin ajan, paitsi AF633:n joka annettiin olla vain tunti. Lopuksi ja aina vasta-aineiden välillä solut huuhdeltiin kolmesti seitsemän minuutin ajan PBS-liuoksella. Lopuksi näytteet pedattiin Vectashieldilla (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), johon oli lisätty 4', 6-diamidino-2-fenyyli-indolia (DAPI, Invitrogen) tumien värjäämiseksi.

Primaarivasta-aineina käytettiin jäniksen E-kadheriini-vasta-ainetta (1:300, AbCam, Cambridge, Iso-Britannia), hiiren vimentini-vasta-ainetta (1:300, Sigma-Aldrich) ja hiiren $\alpha 6$ -integriini-vasta-ainetta (1:300, AbCam). E-kadheriini toimii solujen välisissä liitoksissa erityisesti epiteelisoluissa ja vimentini kuuluu välikokoisiin säikeisiin ja sitä ilmennetään erityisesti mesenkymaalisissa soluissa. $\alpha 6$ -integriini puolestaan on solun pinnan reseptoriproteiini.

Sekundaarivasta-aineina käytettiin Alexa Fluor-väriperheen vuohen AF488-vasta-ainetta (1:300, Invitrogen) hiirelle ja vuohen AF568-vasta-ainetta (1:300, Invitrogen) jänikselle. Lisäksi kaikille soluille käytettiin aktiinisäikeitä värjäävää karpässien AF633-falloidiini-väriä (1:100, Invitrogen). Soluja kuvannettiin Zeiss LSM780 LSCM-konfokaalimikroskoopilla (Zeiss).

3.9. Kaksiulotteinen soluviljely

Soluja kasvatettiin kolmiulotteisen kasvatuksen ohella myös perinteisellä kaksiulotteisella kasvatusalustalla kahden kasvatusmenetelmän välillä mahdollisesti esiintyvien erojen havaitsemiseksi. Proteiinien eristystä varten soluja kasvatettiin 6-kuoppalevyllä 3-5 päivän ajan normaaleissa soluviljelyolosuhteissa. Kokeesta riippuen 3 tai 24 tuntia ennen solujen keräämistä niille vaihdettiin BMP4-pitoinen ja kontrolleille kuljetinpitoinen kasvatusliuos. Solut kerättiin edellä mainitun menetelmän mukaan.

Proliferaatiotutkimuksia varten laskettu määrä soluja (hTERT-HPNE 10000 solua/ml, PANC-1 20000 solua/ml ja MIA PaCa-2 10000 solua/ml) pipetoitiin 24-kuoppalevyille. Solujen annettiin kiinnittyä alustaansa seuraavaan päivään, jolloin tilalle vaihdettiin BMP4-pitoinen tai pelkkää kuljetinta sisältävä kasvatusliuos. Soluja kasvatettiin 7 päivän ajan, jonka aikana niille vaihdettiin BMP4- tai kuljetinpitoinen kasvatusliuos 2-3 päivän välein. Kasvatuksen lopuksi solujen kasvua analysoitiin Z1 Coulter Counter-solulaskimella (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

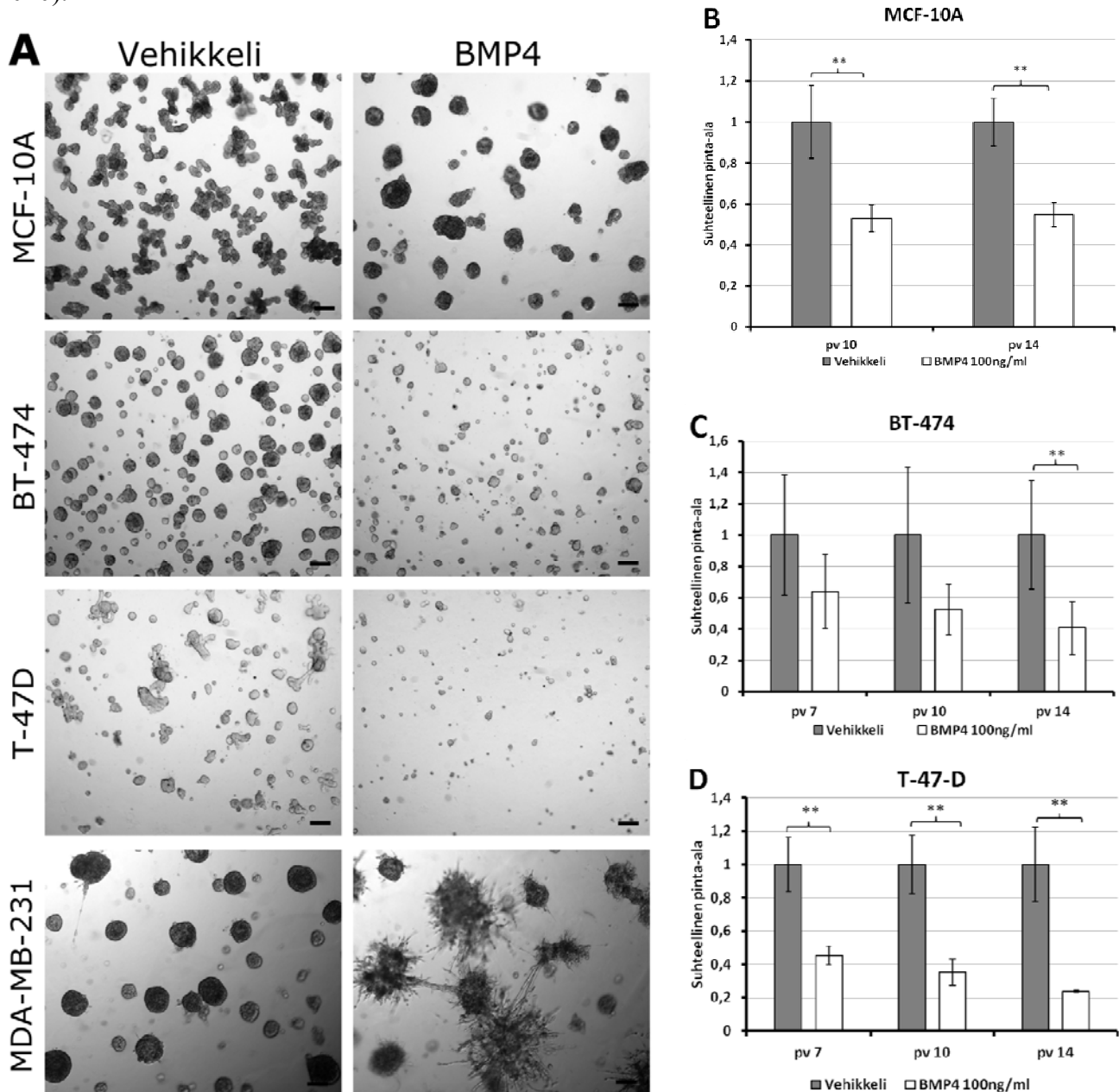
3.10. Tilastomenetelmät

Solumäärien ja solujen muodostamien joukkojen pinta-alojen eroja BMP4- ja kuljetinkäsittelyjen välillä analysoitiin käyttäen Mann-Whitney testiä GraphPad Prism 4-ohjelmassa. P-arvo, joka oli alle 0,05 ($p < 0.05$) tulkittiin merkittäväksi.

4. Tulokset

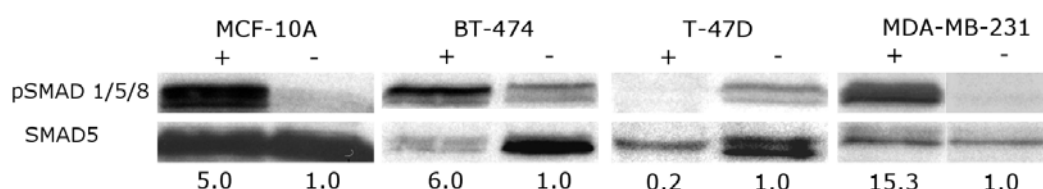
4.1. BMP4:n vaikutukset rintasolujen kasvuun

BMP4-proteiinin tiedetään vähentävän normaalien rintasolujen ja rintasyöpäsolujen kasvua kolmiulotteisessa kasvatuksessa (Ampuja ym. 2013). Tutkimuksessa oli tarkoituksena toistaa nämä aiemmin saadut tulokset ja selvittää lisäksi aktivoituuko Smad-signaalointireitti BMP4:n vaikutuksesta 3D-olosuhteissa, kuten on aiemmin osoitettu 2D-kasvatuksessa (Ketolainen ym. 2010).



Kuva 2. BMP4 vähentää rintasolulinjojen kasvua. Soluja kasvatettiin 14 päivää Matrigelissä. Solut kuvattiin Olympus IX71-mikroskoopilla ja edustavat kuvat päivästä 14 esitetään paneelissa A. (B-D) Solujen kasvua mitattiin analysoimalla niiden viemä pinta-ala esitetyissä aikapisteissä ImageJ:llä ja suhteellinen pinta-ala (keskiarvo±keskihajonta) kuljetinkäsittelyyn verrattuna esitellään kuvassa. Mittajana 250 µm. **P<0,01

BMP4:n ja kuljetinkäsittelyiden vaikutuksia solujen kasvuun tutkittiin kuvantamalla soluja ja laskemalla kuvista solujoukkojen viemä pinta-ala ImageJ-ohjelman avulla. Kaikkien tutkittujen solulinjojen kasvu väheni BMP4:n vaikutuksesta, T-47D:llä jopa lähes 80 % (kuva 2). Aiempien tulosten mukaisesti MDA-MB-231-solulinjalla havaittiin muuntunut, tähtimäinen fenotyyppi, mikä saattaa viitata BMP4-käsittelyn indusoimaan lisääntyneeseen migraatio- ja invaasiokykyyn (Ampuja ym. 2013). Kahden viikon kasvatuksen jälkeen soluista eristettiin proteiinit, joista pyrittiin selvittämään BMP-proteiinien pääasiallisen signalointireitin, Smad-reitin, aktivoituminen Western Blot-menetelmän avulla (kuva 3). Kolmessa neljästä tutkitusta rintasolulinjasta havaittiin BMP4-proteiinin aiheuttama Smad-reitin aktivoituminen vehikkelikäsittelyyn verrattuna. T-47D-soluissa vaikutus oli päinvastainen, sillä BMP4-käsitellyissä soluissa oli alhaisempi Smad-reitin aktivaatiotaso kuin vehikkeli-käsitellyissä soluissa.



Kuva 3. BMP4 vaikuttaa rintasolulinjojen Smad-reitin aktivaatioon proteiinitasolla. Soluja kasvatettiin 14 vrk Matrigelissä ja niistä eristettiin proteiinit. Proteiineja tutkittiin Western Blot-menetelmällä. SMAD 5-tasoa käytettiin proteiinitasojen normalisointiin ja suhteelliset proteiinimäärät kvantitoitiin ImageJ-ohjelmalla. Vehikkelikäsittely asetettiin arvoon 1.0. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-)

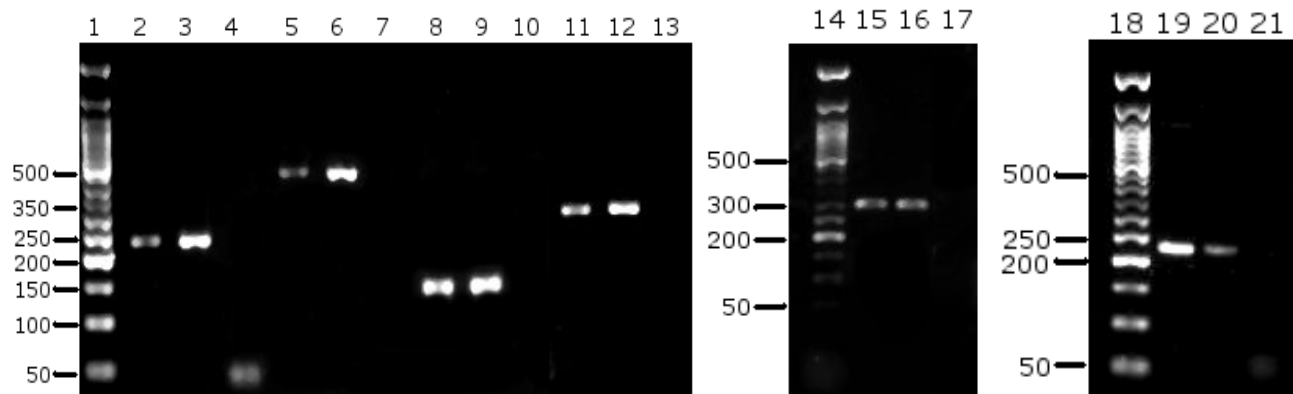
4.2. BMP4:n vaikutukset haimasolujen kasvuun

Tutkittuja haimasoluja oli kolmea eri linjaa ja kukin niistä käsitellään tulosten osalta erikseen. Kaikkia solulinjoja kasvatettiin sekä kaksikulotteisessa että kolmiulotteisessa kasvatuksessa kasvatusolosuhteiden tuottamien mahdollisten erojen havaitsemiseksi. Molemmista kasvatustyypeistä mitattiin BMP4-proteiinin vaikutusta solujen kasvuun solulaskennan, pinta-ala-analyysin tai Alamar Blue-kokeen avulla. Solujen kasvun seuraamisen lisäksi molempien kasvatustyyppien kokeista määritettiin eri käsittelyiden vaikutukset Smad-reitin aktivaatioon ja solusyklin inhibiittorin p21:n ilmentymiseen.

4.2.1. BMP4:n vaikutukset normaaliin immortalisoituun haimasolulinjaan

Koska hTERT-HPNE-solulinja oli tutkimusryhmälle uusi eikä sen kaikkia ominaisuuksia vielä tunnettu, haluttiin kyseisestä solulinjasta tutkia ekspressoituvatko siinä BMP-signalointiin

vaadittavat reseptorit. Saatujen tulosten perusteella havaittiin, että hTERT-HPNE-soluissa ilmentyvät BMP-spesifiset reseptorit ACVR1, ACVR2A, ACVR2B, BMPR1A, BMPR1B ja BMPR2B ja solulinja pystyy siten reagoimaan BMP-signaaleihin reseptoritasolla (kuva 4).



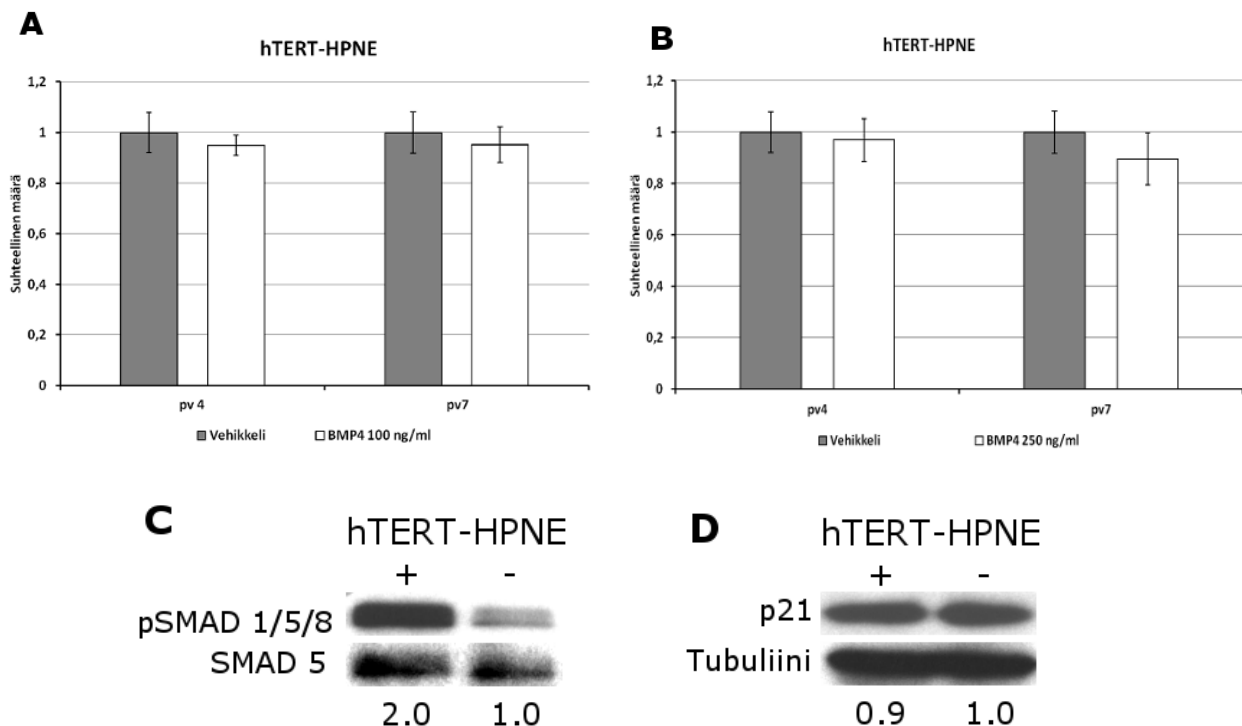
Kuva 4. Normaaleilla immortalisoiduilla haimasoluilla ekspressoituu BMP-signaalointiin tarvittavat reseptorit. Soluja kasvatettiin ilman BMP4- tai vehikkelikäsittelyä normaaleissa soluviljelyolosuhteissa. Soluista eristettiin kokonais-RNA ja se käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi. DNA:ta monistettiin polymeerasiketjureaktion avulla käyttäen reseptorispesifisiä alukkeita. Monistetut DNA-juosteet ladattiin geelille yhdessä positiivisten ja negatiivisten kontrollien kanssa. Ajautuneiden juosteiden koon tunnistamiseen käytettiin kokomarkkeria ja määrittämisestä tärkeimmät koot on merkitty kuviin. Näytteet 1, 14 ja 18 vastaavat kokomarkkeria. Muiden näytteiden sijainnit on esitetty taulukossa 2. Positiivisena kontrollina käytettiin HCC-1419-solujen DNA:ta ja negatiivisena kontrollina vettä.

Taulukko 2. Reseptorimäärittämisä varten tutkitut näytteet.

Nro	Reseptorialukkeet	Näyte
2	BMPR1A (~260ep)	hTERT-HPNE
3		HCC-1419
4		H ₂ O
5	BMPR1B (~450ep)	hTERT-HPNE
6		HCC-1419
7		H ₂ O
8	BMPR2 (~130ep)	hTERT-HPNE
9		HCC-1419
10		H ₂ O
11	ACVR2B (~250ep)	hTERT-HPNE
12		HCC-1419
13		H ₂ O
15	ACVR2 (~300ep)	hTERT-HPNE
16		HCC-1419
17		H ₂ O

19	ACVR1 (~250ep)	hTERT-HPNE
20		HCC-1419
21		H ₂ O

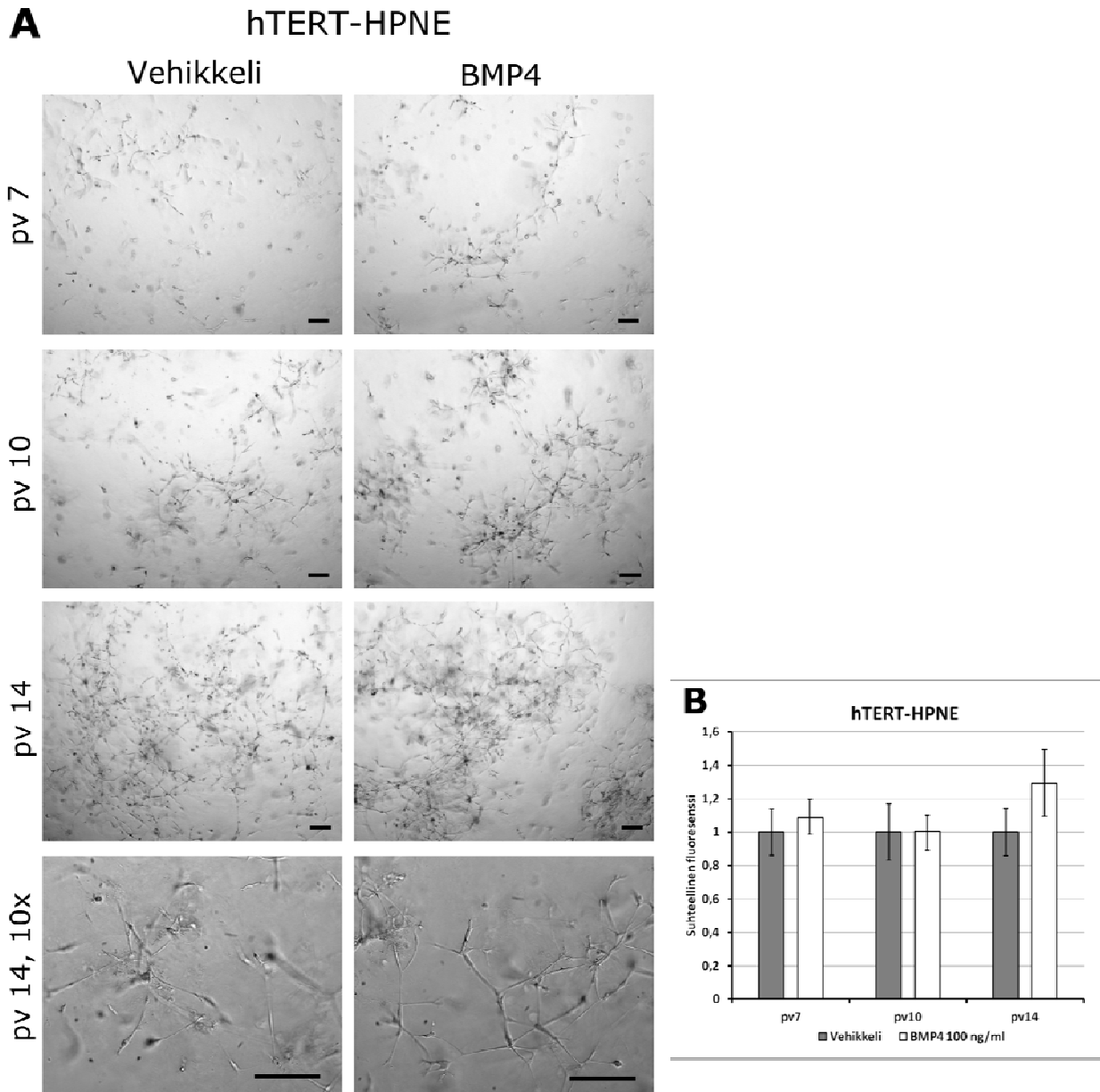
hTERT-HPNE-soluja kasvatettiin perinteisellä kaksikulotteisella kasvatusalustalla BMP4-proteiinin tai kuljetinien läsnä ollessa. Saaduissa tuloksissa BMP4:n ei havaittu vaikuttavan normaaliin haimasolujen kasvuun kahdella eri BMP4-pitoisuudella (100 ng/ml ja 250 ng/ml). Soluissa havaittiin kaksinkertainen Smad-reitin aktivaatiotaso BMP4-käsittelyn jälkeen vehikkelikäsittelyyn verrattuna, mutta ei eroa p21-proteiinin ilmentymisessä (kuva 5). Proteiini-määrityksiä varten soluja kasvatettiin viiden päivän ajan mediumissa, johon oli lisätty 100 ng/ml BMP4 tai kuljetinta.



Kuva 5. BMP4 ei vaikuta normaaliin haimasolujen kasvuun, mutta aktivoi Smad-reitin. (A, B) Soluja kasvatettiin 7 päivää kaksikulotteisessa kasvatuksessa. Solut laskettiin yllämainituissa aikapisteissä Coulter Counter:lla ja solumääriä verrattiin vehikkelikäsittelyyn, joka asetettiin arvoon 1. Kuvassa on esitetty keskiarvo \pm keskihajonta kuudesta rinnakkaisesta näytteestä. (C, D) Proteiinien ilmentymistä analysoitiin Western Blot menetelmällä. SMAD 5 ja α -tubuliinia käytettiin proteiinitasojen normalisointiin ja suhteelliset ekspressiotasot määritettiin ImageJ-ohjelman avulla. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-).

hTERT-HPNE-soluja kasvatettiin myös kolmiulotteisessa kasvatuksessa. Soluja kasvatettiin kahden viikon ajan Matrigelissä BMP4- tai kuljetinipitoisen (100 ng/ml) kasvatusliuoksen läsnä ollessa. Solujen kasvua havainnollistettiin kuvantamisella ja Alamar Blue-kokeella. BMP4-käsittelyn ei

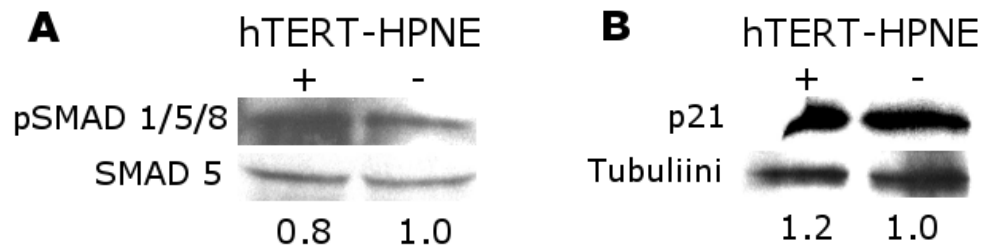
havaittu vaikuttavan solujen kasvuun myöskään tässä kasvatusmallissa, kuten voidaan nähdä kuvasta 6. Soluista ei voitu niiden haaroittuneen muodon vuoksi määrittää solujen viemää pinta-alaa.



Kuva 6. BMP4 ei vaikuta normaalien haimasolujen kasvuun kolmiulotteisessa kasvatuksessa. Immortalisoituja hTERT-HPNE soluja kasvatettiin 14 vrk Matrigelissä. Soluja kuvannettiin päivinä 7, 10 ja 14 ja edustavat kuvat on esitetty kuvassa A. Solujen kasvua seurattiin Alamar Blue-analyysillä (B) samoina aikapisteinä (keskiarvo±keskihajonta). Mittajana 250µm.

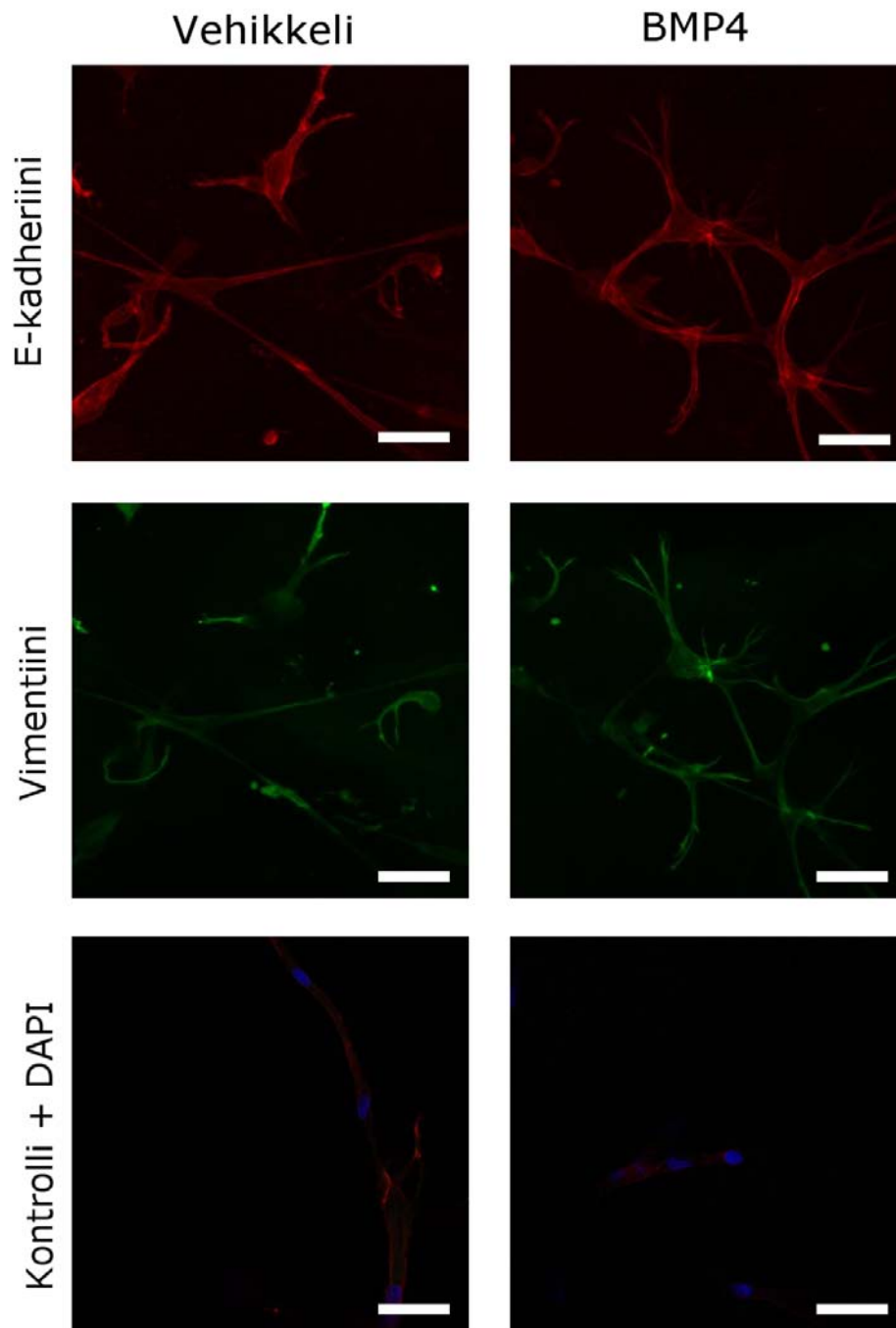
Kolmiulotteisen kasvatuksen jälkeen hTERT-HPNE-soluista eristettiin proteiinit ja solujen p21 proteiinin ekspressiota ja Smad-reitin aktivoitumista tutkittiin Western Blot-analyysin avulla. Analyysin perusteella havaittiin Smad-reitin olevan aktiivinen sekä BMP4- että kuljetinkäsitellyissä

soluissa, ilman suurta eroa aktiivisuuden tasossa. Myös p21:n ilmeneminen on havaittavissa sekä BMP4- että kuljetinkäsittelyissä soluissa (kuva 7). p21:ssa voidaan havaita vain hienoinen kasvu BMP4-käsittelyn vuoksi vehikkelikäsittelyyn verrattuna.



Kuva 7. BMP4-käsittely ei vaikuta Smad-reitin aktivoitumiseen ja p21:n ekspressioon normaaleissa immortalisoiduissa haimasoluissa. hTERT-HPNE-soluja kasvatettiin 14 vrk Matrigelissä, soluista eristettiin proteiinit ja Smad-reitin aktivoitumista(A) ja p21-induktiota (B) tutkittiin Western Blot-analyysillä. Proteiinimäärien normalisointissa käytettiin SMAD 5 ja α -tubuliini-vasta-aineita. Suhteelliset ekspressiotasot määritettiin ImageJ-ohjelman avulla. Vehikkelikäsittely asetettiin arvoon 1.0. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-)

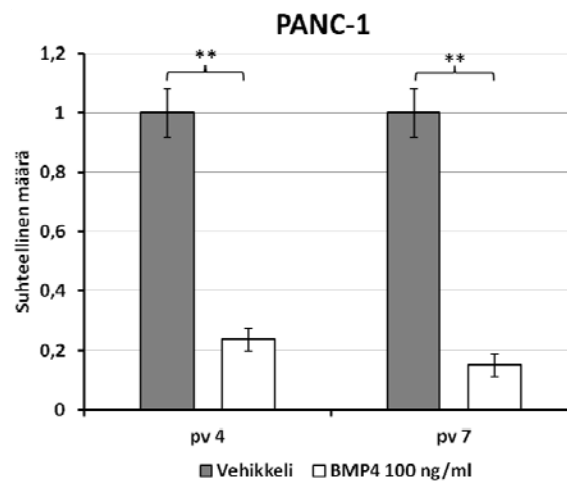
Normaaleista haimasoluista tutkittiin myös BMP4-käsittelyn vaikutukset solujen vimentiini- ja E-kadheriinitasoihin. Soluja kasvatettiin immunofluoresenssivärjäysten kuvantamiseen sopivalla lasialustalla Matrigelissä kahden viikon ajan. Kasvatusajan kuluttua solut kiinnitettiin sen hetkiseen tilaansa ja solut värjättiin tutkittavana olevia proteiineja vastaan valmistetuilla vasta-aineilla. BMP4- ja kuljetinkäsittelyjen välillä ei havaittu eroa vimentiinin ja E-kadheriinin ilmentymisessä. Immunofluoresenssivärjäyksen avulla solujen morfologiasta saatiin myös tietoa tavallista kuvantamista paremmin ja voitiin havaita, ettei BMP4-käsittely vaikuta hTERT-HPNE-solujen morfologiaan (kuva 8).



Kuva 8. BMP4-käsittely ei vaikuta normaalien haimasolujen vimentini- ja E-kadheriini-ilmentymiseen kolmiulotteisessa kasvatuksessa. Soluja kasvatettiin Matrigelissä 14 vrk Chamber glass-alustalla, kasvatusliuoksessa, joka sisälsi 100 ng/ml BMP4 tai kuljetinta. Solut värjättiin vimentinin ja E-kadheriinin vasta-aineilla ja tumia visualisoitiin DAPI:lla. Mittajana 50µm.

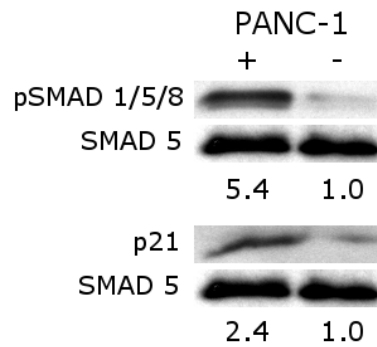
4.2.2. PANC-1

BMP4-proteiinin tiedetään vähentävän PANC-1-haimasyöpäsolujen kasvua kaksikulotteisessa kasvatuksessa (Virtanen ym. 2011). Soluja kasvatettiin kaksikulotteisella kasvatusalustalla ja päivinä 4 ja 7 solut laskettiin. Tutkimuksessa varmistettiin jo aikaisemmin julkaistut tulokset, sillä BMP4-käsittelyn havaittiin vähentävän PANC-1-haimasyöpäsolujen kasvua jopa yli 80 % viikon tutkimusajanjaksolla (kuva 9).



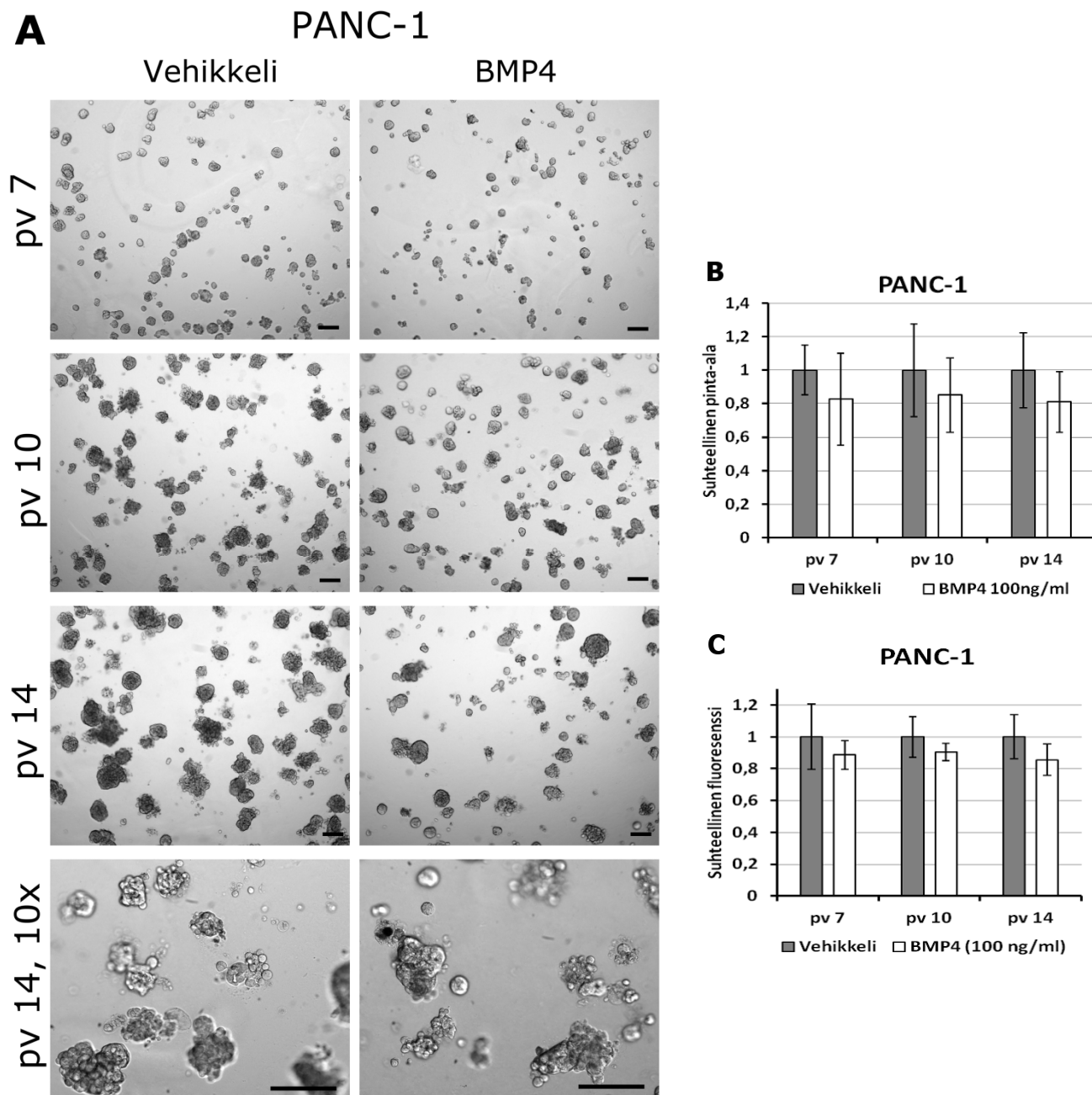
Kuva 9. BMP4 vähentää selvästi PANC-1 haimasyöpäsolujen kasvua. Soluja kasvatettiin kaksikulotteisella soluviljelyalustalla 7 vuorokauden ajan. Solut laskettiin Coulter Counterilla päivinä 4 ja 7 ja tulokset esitetään yllä olevassa taulukossa keskihajontoineen ja keskiarvoineen. Kuljetinkäsitellyt solut asetettiin arvoon 1. $**p < 0.01$

Solujen proteiiniekspression tutkimista varten PANC-1-soluja kasvatettiin neljä vuorokautta kaksikulotteisella kasvatusalustalla. Kolme tuntia ennen solujen keräämistä soluille vaihdettiin kasvatusliuos, joka sisälsi 100 ng/ml kuljetinta tai BMP4-proteiinia. Solut kerättiin ja niistä eristettiin proteiinit Western Blot analyysiä varten. BMP4-käsittely lisäsi solujen Smad-reitin aktivoitumista yli viisinkertaisesti kuljetinkäsiteltyihin soluihin verrattuna. Lisäksi BMP4 indusoi p21-solusykli-inhibiittorin ilmentymistä 2.4-kertaisesti (kuva 10).



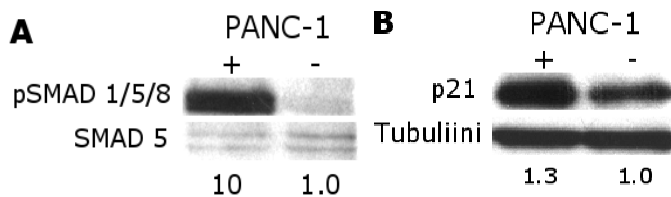
Kuva 10. BMP4 vaikuttaa kaksisuolotteisesti kasvatettujen PANC-1 solujen proteiini-ekspressioon. Soluja kasvatettiin 4 päivän ajan 6-kuoppalevyllä ja niistä eristettiin proteiinit. Smad-reitin aktivoitumista ja p21:n ilmentymistä soluissa tutkittiin Western Blot analyysin avulla. Proteiinimäärien suhteuttamisessa käytettiin SMAD 5- tasoa. Suhteelliset proteiinimäärät laskettiin ImageJ:n avulla ja vehikkelikäsittely asetettiin arvoon 1.0. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-)

Kasvatusalustojen aiheuttamien mahdollisten erojen havaitsemisen vuoksi PANC-1-soluja kasvatettiin 14 vuorokautta Matrigelissä. Soluja käsiteltiin kasvatusaikana kasvatusmediumilla, johon oli lisätty 100 ng/ml BMP4 tai kuljetinta. Soluja kuvannettiin päivinä 7, 10 ja 14 ja lisäksi samoina päivinä soluille suoritettiin solujen aineenaihdunnan aktiivisuutta mittaava Alamar Blue-koe. Kuvasta 11 voidaan havaita, että BMP4-käsittely vähentää solujen kasvua silmämääräisesti, mutta kuva-analyysin avulla ei kuitenkaan saatu tilastollisesti merkittävää eroa solujen pinta-alassa. Myöskään Alamar Blue-menetelmällä ei havaittu eroa solujen kasvussa.



Kuva 11. BMP4 ei vaikuta PANC-1 haimasyöpäsolujen kasvuun kolmiulotteisessa kasvatuksessa. PANC-1-soluja kasvatettiin 14 vuorokautta Matrigelissä. Solut kuvattiin päivinä 7, 10 ja 14(A) ja kuvista laskettiin solujen pinta-ala (B). Samoina aikapisteinä solujen aineenvaihduntaa mitattiin myös Alamar Blue-menetelmällä(C). Kaavioissa tulokset esitetty keskiarvoina ja keskihajontoina. Mittajana 250µm.

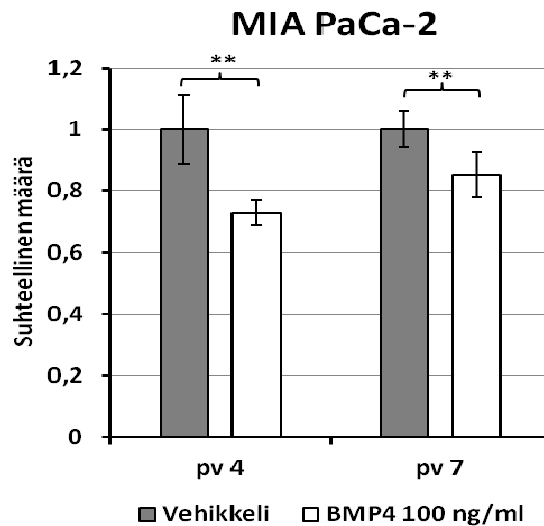
PANC-1-solujen kolmiulotteisesta kasvatuksesta eristettiin solujen tuottamat proteiinit päivänä 14 Western Blot-analyysiä varten. Kokonaisproteiinimäärästä haluttiin tutkia Smad-reitin aktivoituminen ja p21-solusykli-inhibiittorin ilmentyminen. BMP4-käsittely lisäsi Smad-reitin aktiivisuutta kymmenkertaisesti vehikkeli-käsittelyyn verrattuna. Lisäksi BMP4-käsittely lisäsi PANC-1-soluissa p21:n ilmentymistä (kuva 12).



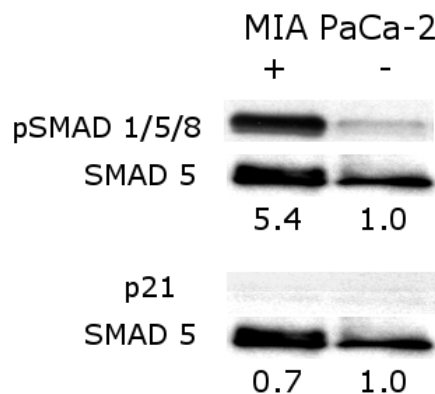
Kuva 12. BMP4 vaikuttaa PANC-1 solujen p21-ekspressiotasoon ja Smad-reitin aktivoitumiseen. Soluja kasvatettiin Matrigelissä 14 vrk ja niistä eristettiin proteiinit. Proteiinitasoja(A, B) tutkittiin Western Blot-analyysillä ja suhteelliset ilmentymistasot laskettiin ImageJ:n avulla. Proteiinimäärien normalisoimiseksi käytettiin SMAD 5- ja α -tubuliini-vasta-aineita. Vehikkelikäsittely asetettiin arvoon 1.0. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-).

4.2.3. MIA PaCa-2

BMP4-käsittelyn tiedetään vähentävän MIA PaCa-2-haimasyöpäsolujen kasvua perinteisellä kaksikulotteisella kasvatusalustalla (Virtanen ym. 2011). Soluja kasvatettiin 7 vuorokautta BMP4- tai kuljetinpitoisen (100 ng/ml) kasvatusliuoksen läsnäollessa. Päivinä 4 ja 7 solut laskettiin Coulter Counter-laitteella ja tulokset esitetään kuvassa 13. BMP4-käsittelyn havaittiin vähentävän solujen kasvua jo päivänä 4 yli 20 % ja päivänä 7 lähes 20 %. Kasvun muutosten lisäksi soluista tutkittiin BMP4-käsittelyn vaikutukset Smad-reitin aktivoitumiseen ja p21-ilmentymiseen. Tätä varten soluja kasvatettiin 4 vuorokautta 6-kuoppalevyllä. 3 tuntia ennen solujen keräämistä soluille vaihdettiin 100 ng/ml BMP4 tai kuljetinta sisältävä kasvatusliuos. Inkubaatioajan jälkeen solut kerättiin ja niistä eristettiin proteiinit Western Blot-analyysiä varten. Kuvasta 14 voidaan nähdä, että BMP4-käsittely lisää Smad-reitin aktivoitumista yli viisinkertaisesti vehikkelikäsittelyyn verrattuna, mutta p21-induktiota ei tapahdu.



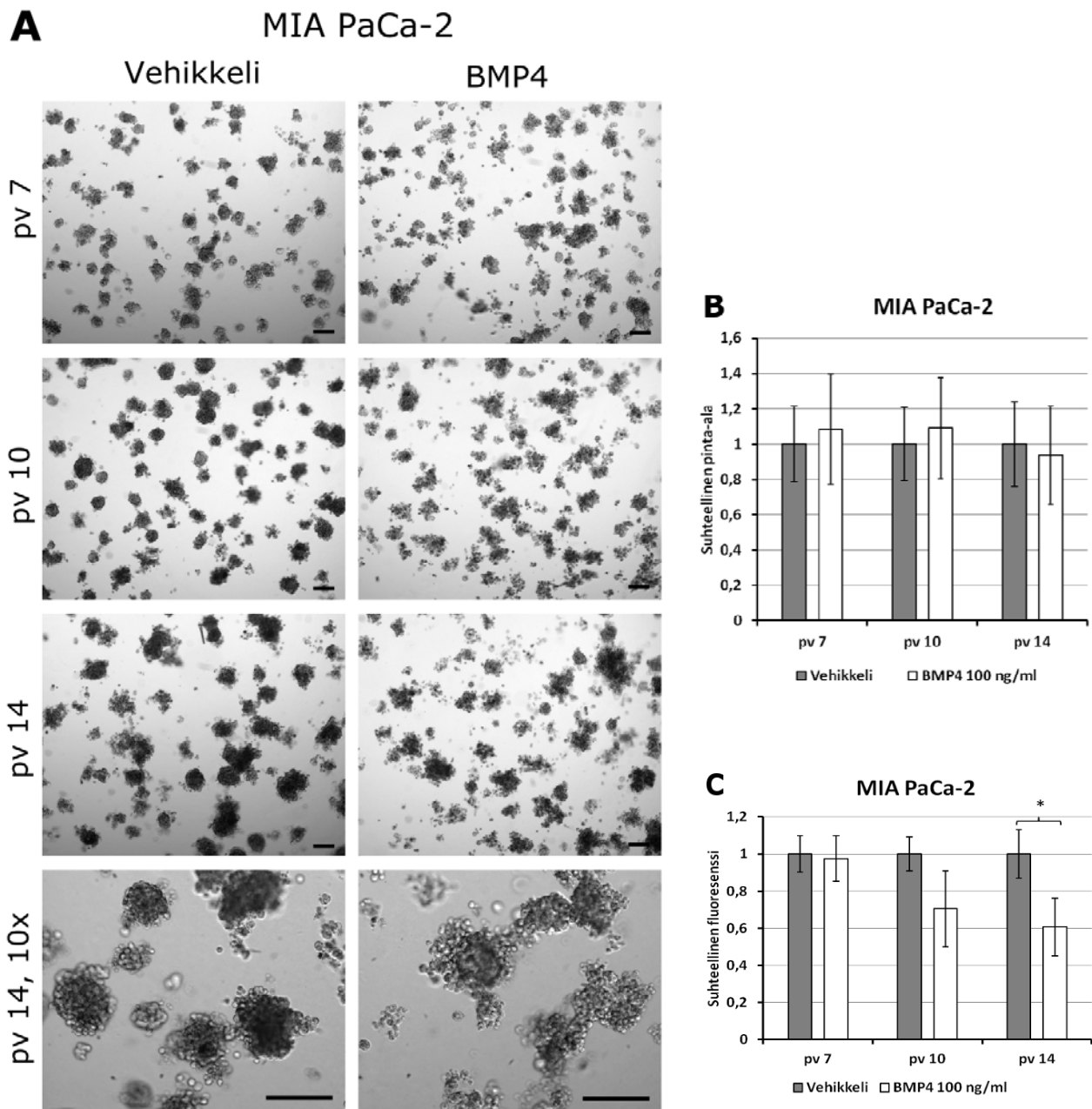
Kuva 13. BMP4 vähentää MIA PaCa-2 haimasyöpäsolujen kasvua. Soluja kasvatettiin 7 vuorokautta kaksikulotteisella soluviljelyalustalla. Solut laskettiin Coulter Counterilla päivinä 4 ja 7 ja tulokset esitetään kuvassa keskiarvoineen ja keskihajontoineen. Vehikkelikäsittely asetettiin arvoon 1. $^{***}p < 0,01$



Kuva 14. BMP4 aktivoi Smad-reitin MIA PaCa-2-haimasyöpäsoluissa, mutta ei indusoi p21:n ilmentymistä kaksikulotteisessa kasvatuksessa. Proteiinitasoa tutkittiin Western Blot-menetelmällä ja suhteelliset proteiini määrät laskettiin ImageJ:n avulla. Proteiinitasojen normalisoinnissa käytettiin SMAD 5- vasta-ainetta. Vehikkelikäsittely asetettiin arvoon 1.0. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-)

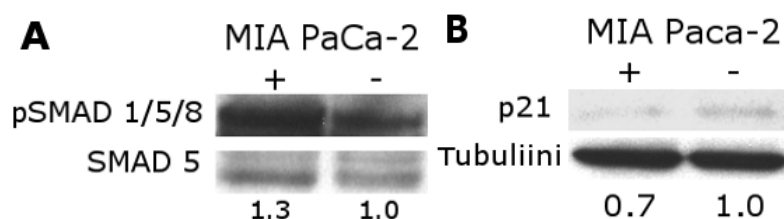
Koska haluttiin tutkia vaikuttaako kasvatusalusta BMP4:n vaikutuksiin soluissa, myös MIA PaCa-2 soluja kasvatettiin 14 vuorokauden ajan Matrigelissä. Soluille käytettiin kasvatuksen aikana kasvatusliuosta, johon oli lisätty 100 ng/ml BMP4-proteiinia tai kuljetinta. Soluja kuvannettiin päivinä 7, 10 ja 14 ja samoina päivinä solujen aineenvaihdunnan aktiivisuutta mitattiin Alamar Blue-kokeella. Otetuista kuvista määritettiin solujen viemä pinta-ala (kuva 15). BMP4-käsiteltyjen solujoukkojen voitiin silmämääräisesti nähdä olevan pienempiä ja ohuempia ja solujen pirstaloituvan kasvatusalustalla. Pinta-ala-analyysin tekeminen tuotti vaikeuksia, sillä solut kasvoivat geelissä monessa eri tasossa ja tästä johtuen tarkkojen kuvien ottaminen oli haastavaa.

Päivänä 14 Alamar Blue-analyysin perusteella soluja oli BMP4-käsittelyn jäljiltä merkittävästi vähemmän tai niiden aineenvaihdunta oli kuljetinkäsiteltyjä soluja vähäisempää.



Kuva 15. BMP4-käsittely vähentää MIA PaCa-2 solujen kasvua kolmiulotteisessa kasvatuksessa ja muuttaa solujoukkojen morfologiaa. MIA PaCa-2-haimasyöpäsoluja kasvatettiin 14 vrk Matrigelissä. Solut kuvattiin päivinä 7, 10 ja 14 (A) ja kuvista määritettiin solujen viemä pinta-ala (B). Samoissa aikapisteissä solujen aineenvaihduntaa mitattiin Alamar Blue-menetelmällä (C). Taulukoissa B ja C arvot esitetty keskiarvoineen ja keskihajontoineen suhteutettuna vehikkelikäsitelyyn. Mittajana 250 μ m. * $p < 0.05$

MIA PaCa-2-solujen kolmiulotteisesta kasvatuksesta eristettiin solujen tuottamat proteiinit päivänä 14 ja niitä analysoitiin Western Blot-menetelmällä (kuva 16). Tulosten perusteella BMP4 lisää hieman Smad-reitin aktiivisuutta soluissa ja ei indusoi p21:n ilmentymistä kolmiulotteisessa kasvatuksessa.



Kuva 16. BMP4 aktivoi Smad-reitin MIA PaCa-2-soluissa, mutta ei indusoi p21:n ilmentymistä. Soluja kasvatettiin kolmiulotteisessa kasvatuksessa 14 vrk. Solut kerättiin ja niistä eristettiin proteiinit Smad-reitin aktivoitumisen (A) ja p21-induktion (B) selvittämiseksi. Totaaliproteiininimäärien selvittämiseksi käytettiin SMAD 5- ja α -tubuliini-vastaaineita. Kuvista analysoitiin suhteelliset proteiininimäärät ImageJ:n avulla. Vehikkeli asetettiin arvoon 1.0. BMP4-käsittely (+), kuljetinkäsittely (-)

5. Tulosten tarkastelu

5.1. BMP4:n vaikutukset rintasoluihin

BMP4:n tiedetään vähentävän rintasyöpäsolujen kasvua kaksikulotteisessa kasvuympäristössä ja joko lisäävän tai vähentävän niiden migraatiota ja invaasiota (Ketolainen ym. 2010, Guo ym. 2012). Kaksikulotteisessa kasvatuksessa BMP4-käsittelyn on havaittu aktivoivan Smad-reitin ja lisäävän solusykli-inhibiittori p21:n ekspressiota solulinjaspesifisesti ja näiden kahden tapahtuman voidaan havaita korreloivan keskenään (Ketolainen ym. 2010, Ampuja ym. 2013). Nykyisten tutkimustulosten valossa voitaneen siis sanoa, että BMP4 lisää Smad-reitin aktivaatiota ja lisää p21-induktiota useissa rintasyöpäsolulinjoissa kaksikulotteisessa kasvatuksessa. Sama ilmiö on havaittu myös BMP7:n ja BMP2:n tapauksessa (Pouliot & Labrie 2002, Pardali ym. 2005).

BMP4:n on aikaisemmin havaittu vähentävän rintasyöpäsolujen kasvua myös kolmiulotteisessa kasvatuksessa Matrigelissä. Erilaisten vaikutusten on kuitenkin todettu riippuvan tutkituista solulinjoista ja käytetystä kolmiulotteisesta kasvatusmateriaalista (Ampuja ym. 2013). Tässä tutkimuksessa varmistettiin BMP4-ligandin aiheuttama kasvun vähentyminen kolmiulotteisessa kasvatuksessa ja tutkittiin Smad-reitin aktivoitumista usealla rintasyöpäsolulinjalla ja normaalilla rintasolulinjalla. BT-474 ja MDA-MB-231-rintasyöpäsoluilla ja MCF-10A-normaalisolulla havaittiin Smad-reitin selvä aktivaatio BMP4:n indusoimana. Ampuja ym. (2013) tutkimuksessa Matrigelissä kasvatetuilla BT-474:lla ja MDA-MB-231:lla on aikaisemmin havaittu indusoituvan p21 BMP4-käsittelyn jälkeen, mikä tukee näiden solulinjojen toimivan tämän ominaisuuden osalta kolmiulotteisessa kasvatuksessa samoin kuin kaksikulotteisessa kasvatuksessa. Normaalilla MCF-10A-solulinjalla ei ole havaittu kasvanutta p21-induktiota kasvutekijän käytön jälkeen 3D-ympäristössä proteiinitasolla, mutta tässä tutkimuksessa Smad-reitin havaittiin aktivoituvan selvästi. Normaalin rintasolulinjan kasvun pysähtymiseen vaikuttaa siis jokin muu mekanismi kuin p21-välitteinen kasvuihbitio, mutta kahdella syöpäsolulinjalla (BT-474 ja MDA-MB-231) kasvun pysähtyminen vaikuttaisi johtuvan Smad-reitin aktivoitumisesta johtuvan p21-solusykli-inhibiittorin lisääntymisestä soluissa. T-47D-solulinjan kohdalla selvä p21-induktio ja Smad-reitin aktivoituminen on havaittu 2D-kasvatuksessa ja lisäksi p21-induktio myös kolmiulotteisessa kasvatuksessa, mutta tässä tutkimuksessa ei havaittu Smad-reitin aktivaatiota, vaikka kasvussa nähtiinkin selvä vähentyminen BMP4-käsittelyn jälkeen. Rintasoluista saatu tutkimustieto osoittaa siis, että BMP4:n aiheuttama kasvun väheneminen voi välittyä Smad-reitin tai jonkin muun signalointireitin kautta ja että taustalla voi olla p21:n ilmentyminen, mutta ei välttämättä. Tästä

tutkimuksesta selvisi siis, että monissa solulinjoissa Smad-reitti aktivoituu sekä kaksi- että kolmiulotteisessa kasvatuksessa BMP4-käsittelyn seurauksena.

5.2. BMP4:n vaikutukset haimasoluihin

2D-kasvatuksissa BMP4-ligandin tiedetään vähentävän haimasyöpäsolujen kasvua ja lisäävän niiden invaasiota ja migraatiota solulinjaspesifisesti (Gordon ym. 2009, Virtanen ym. 2011). Lisäksi BMP4:n on todettu lisäävän haimasyöpäsolujen epiteeli-mesenkymaalitransitiota (Hamada ym. 2007). Haimasyöpäsoluja on tutkittu aikaisemmin myös Matrigelissä ilman käsittelyjä ja tässä tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella solujoukkojen muoto vastaa aikaisempia tuloksia (Gutierrez-Barrera ym. 2007). Haimasyöpäsoluja on kasvatettu myös esimerkiksi agarosissa ja metyyliiselluloosassa, mutta koska kasvatusalustan tiedetään vaikuttavan solujen morfologiaan, ei näistä tutkimuksista saatuja tuloksia voida täysin verrata keskenään (Wen ym. 2013, Longati ym. 2013).

Aikaisemmissa tutkimuksissa haimasyöpäsoluissa BMP4:n on havaittu lisäävän Smad-reitin aktivaatiota 2D-kasvatuksessa monissa haimasyöpäsolulinjoissa, kuten MIA PaCa-2:ssa, mutta ei juurikaan PANC-1- soluissa. Tutkimuksessa havaittiin myös vahva fosfo-Smad-taso vehikkelikäsitellyissä soluissa (Virtanen ym. 2011). Tutkittaessa PANC-1-solujen Smad1-fosforylaatiota BMP4-käsittelyn jälkeen, Gordon ym. (2009) havaitsivat tasojen nousevan kuitenkin selvästi. Tässä tutkimuksessa havaittiin selvä Smad-reitin aktivaatio molemmissa haimasyöpäsolulinjoissa BMP4-käsittelyn jälkeen ja vain hento pohjataso vehikkelikäsitellyissä soluissa kaksikulotteisessa kasvatuksessa. Tuloksissa on siis ristiriitaa, mikä saattaa osaltaan johtua erilaisten vasta-aineiden käytöstä ja kasvutekijän erilaisesta inkubaatioajasta. Kaksikulotteisista kasvatuksista tutkittiin myös p21-induktio BMP4-käsittelyn jälkeen ja kyseinen ilmiö havaittiin vain PANC-1-soluissa. Vaikuttaa siis siltä, että PANC-1-soluissa BMP4 vähentää solujen kasvua Smad-reitin aktivoitumisen aiheuttamalla p21-induktiolla, kun taas MIA PaCa-2-soluissa BMP4 vähentää solujen kasvua jollain muulla mekanismilla kuin Smad-reitin aktivoitumisen aiheuttamalla p21-induktiolla. Tosin, MIA PaCa-2-soluissa nähty kasvun väheneminen oli myös huomattavasti vähäisempää kuin PANC-1-soluissa.

Kolmiulotteisessa kasvatuksessa vain MIA PaCa-2- soluissa havaittiin kasvuero eri käsittelyiden välillä päivänä 14 solujen aineenvaihdunnan tasoa mittaavassa Alamar Blue-kokeessa. Päivänä 14 nähty kasvuero oli kuitenkin samansuuntainen kaksikulotteiseen kasvatukseen verrattaessa. BMP4-käsittelyn havaittiin lisäävän PANC-1-solujen Smad-reitin aktiivisuutta jopa kymmenkertaisesti,

mutta p21-indusoitui soluissa vain hieman vehikkelikäsittelyä enemmän. MIA PaCa-2-soluissa Smad-reitin aktivaatio kasvoi vain 1.3-kertaiseksi vehikkelikäsittelyyn verrattuna ja p21-taso oli jopa vehikkelikäsittelyä pienempi. Täten voitaneen sanoa, että MIA Paca-2-soluissa nähty BMP4-proteiinin aiheuttama kasvuero välittyy mahdollisesti Smad-reitin kautta, mutta siihen ei vaikuta p21:n toiminta. Kolmiulotteisesti kasvatettujen PANC-1-solujen voimakas Smad-reitin aktivaatio ei taas vaikuta solujen kasvuun ja lisää vain hieman p21-proteiinin ilmentymistä. PANC-1-soluissa 2D:ssä nähty selvä kasvun väheneminen BMP4-proteiinin aiheuttamana ei siis tullut ilmi kolmiulotteisessa kasvatuksessa. Haimasyövän hoidossa yleisesti käytettyjen lääkeaineiden tiedetään vähentävän solujen kasvua selvästi vähemmän kolmiulotteisessa kasvatuksessa kaksikulotteiseen kasvatukseen verrattaessa (Wen ym. 2013, Longati ym. 2013) ja lisäksi kolmiulotteisen kasvatusalustan tiedetään parantavan syöpäsolujen resistanssia apoptoosia vastaan (Hongisto ym. 2013)

Tutkimuksessa käytetty normaali haimasolulinja hTERT-HPNE eroaa morfologialtaan huomattavasti käytetyistä haimasyöpäsolulinjoista. Solulinjan havaittiin ilmentävän sekä mesenkymaalisten että epiteelimaisten solujen proteiineja eikä BMP4-käsittely muuttanut näitä ominaisuuksia. Kaksikulotteisessa kasvatuksessa BMP4 lisäsi solujen Smad-reitin aktiivisuutta, mutta ei vaikuttanut solujen kasvuun tai p21-ilmentymiseen. Kolmiulotteisessa kasvatuksessa BMP4-käsittely ei vaikuttanut solujen ominaisuuksiin eikä juurikaan muuttanut solujen Smad-reitin aktiivisuutta tai p21-ilmentymistä. Solujen voitiin kuitenkin havaita ilmentävän BMP-spesifisiä reseptoreja, joten signaalintireittien aktivoituminen on mahdollista.

6. Yhteenveto

Tämä tutkimus osoitti, että rintasyöpäsoluissa BMP4-käsittely tuottaa samankaltaisen vasteen sekä kaksikulotteisessa että kolmiulotteisessa Matrigel-kasvatuksessa, eli vähentää solujen kasvua. Lisäksi kaksikulotteisessa kasvatuksessa havaitut muutokset proteiinien ekspressiotasoissa ja solunsisäisten signaalintireittien aktiivisuudessa voidaan havaita myös 3D-kasvatuksessa solulinjaspesifisesti. Matrigel-kasvatusalustan tiedetään muistuttavan erityisesti rinnan epiteelisolujen luonnollista tyvikalvon koostumusta, mikä saattaisi viitata siihen että tietyissä rintasyövässä oikein annosteltu BMP4 saattaisi vähentää rintasyöpäkasvaimen kokoa. Toisaalta, koska tiedetään että BMP4 myös lisää tiettyjen rintasyöpäsolulinjojen liikkumiskykyä (Ketolainen ym. 2010, Guo ym. 2012), tulisi ensin selvittää mekanismit lisääntyneen liikkumiskyvyn indusoimisessa, jotta hoidosta ei koituisi etäpesäkkeiden lisääntynyttä määrää. Viitteitä on jo esitetty esimerkiksi matriksin

metalloproteinaasien lisääntyneestä aktiivisuudesta BMP4-käsittelyn jälkeen (Guo ym. 2012, Ampuja ym. 2013).

Haimasyövän osalta tästä tutkimuksesta saadut tulokset eivät ole yhtä selviä. Solujen vasteet BMP4-proteiinille erosivat kaksikulotteisesta kasvatuksesta saaduista tuloksista kasvun hidastumisen osalta. Tutkituissa solulinjoissa tiedetään kuitenkin ekspressoituvan BMP-signaalointiin liittyvät komponentit, kuten BMP-reseptorit ja Smad-reitin jäsenet, joten periaatteessa BMP4 kykenee välittämään vaikutuksensa soluihin (Gordon ym. 2009). Kolmiulotteisen kasvatuksen tiedetään vähentävän solujen apoptoosiin ajautumista antamalla soluille kasvua edistäviä viestejä (Hongisto ym. 2013), mikä saattaa haimasyövän tapauksessa kumota BMP4-proteiinin aiheuttaman kasvurajoituksen. Haimasyöpäsolujen kuvantaminen oli teknisesti vaikeaa niiden muodostamien epäsuorallisten rakenteiden vuoksi ja lisäksi käytetty kuva-analyysi-ohjelma ei tulkinut kuvia silmin havaitsemisen kanssa yhtäläisesti. Haimasolujen kasvua mitattiin myös Alamar Blue-kokeella, joka mittaa solujen lukumäärää epäsuoralla tavalla, joten se ei välttämättä kuvaa todellista solumäärää. Tästä johtuen, on mahdollista että todellinen kasvuero eri käsittelyiden välillä oli havaittua suurempi. Tämä tutkimus vahvisti aiemmin saatuja tuloksia siitä, että BMP4:n vaikutukset solujen kasvuun ovat yksilöllisiä ja toisinaan puuttuvat kokonaan.

Kolmiulotteisen kasvatusalustan käyttö syöpäsolujen tutkimisessa on edistänyt tutkimusta ja lisännyt tietoa monista syöpään liittyvistä mekanismeista. Nykyisissä soluviljelymenelmissä keskitytään kuitenkin pääasiassa kasvainsoluihin ja niiden luonnollisesti esiintyvä mikroympäristö, kuten tulehdus- ja stroomasolut jätetään huomiotta. Näillä menetelmillä on rajoituksensa liittyen muun muassa solujen ja matriksin välisiin interaktioihin (Sung ym. 2013). Varsinkin viime aikoina on siirrytty useiden solutyypin kasvatukseen yhdessä, nk.ko-kulttuuriin tai spheroidikasvatukseen. Esimerkiksi syöpäsolujen ja strooman fibroblastien ko-kulttuureiden on havaittu indusoivan merkittäviä muutoksia tuumorin kasvuun. Kasvainta ympäröivillä muilla solutyypeillä voi olla merkittävä rooli lisäksi esimerkiksi epiteelisolujen apoptoosiin ja invaasion etenemiseen sytokiinien, kasvutekijöiden ja proteaasien lisääntyneen erityksen myötä (Sung ym. 2013, Fang ym. 2013). Spheroidit taas koostuvat suuremmista solumassoista, kuten kokonaisista kasvaimen paloista ja niissä voi esiintyä joko yhden tai useamman tyyppin soluja. Nämä aggregaatit voivat mimikoida kasvaimen toimintaa paremmin kuin tavalliset 2D- ja 3D-mallit, sillä kuten useissa oikeissakin kasvaimissa, myös sferoideissa on jakaantuvia ja jakaantumattomia soluja sekä happirikkaita ja hapenpuutteesta kärsiviä alueita. On todettu, että hypoksia saattaa vaikuttaa solujen lääkeresistiivisyyteen ja sädehoidon tehokkuuteen (Smalley ym. 2006, Yamada & Cukierman 2007, Liu ym. 2013). Tulevaisuudessa kokulttuureja ja sferoideja voitaisiin kokeilla myös

haimasyöpätutkimuksessa yhdistettynä BMP4-proteiinin käyttöön. Tässä tutkimuksessa käytettyä kolmiulotteista koeasetelmaa voidaan kuitenkin jo nyt hyödyntää moniin tarkoituksiin. Esimerkiksi rintasyöpäsolujen kolmiulotteisessa kasvatuksessa syntyvän solujen morfologian on havaittu korreloivan niiden invasiivisuuden kanssa (Kenny ym. 2007).

BMP-proteiinien merkitys syövän kehittymiselle on vasta selviämässä tutkijoille. Aiheeseen liittyvää tutkimusta on melko paljon, mutta tutkimuksista saatuja tuloksia on vielä vaikea soveltaa lääketieteen apukeinoiksi. Koska erilaiset syöpätaudit yleistyvät väestössä jatkuvasti esimerkiksi elintavoista ja väestön vanhenemisesta johtuen, on näihin sairauksiin suuri tarve löytää lisää hoitokeinoja. Esimerkiksi geeniteknologian ja molekyylibiologian jatkuvasti kehittyvien menetelmien avulla tähän tehtävään on mahdollista tarttua entistä paremmin.

Kirjallisuus

- Alarmo EL, Huhtala H, Korhonen T, Pylkkanen L, Holli K, Kuukasjarvi T, et al. 2013. Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26, 10-21.
- Alarmo EL, Kuukasjarvi T, Karhu R & Kallioniemi A. 2007. A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7. *Breast Cancer Research and Treatment* 103, 239-246.
- Alarmo E-, Pärssinen J, Ketolainen JM, Savinainen K, Karhu R & Kallioniemi A. 2009. BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Letters* 275, 35.
- Alarmo E & Kallioniemi A. 2010. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis? *Endocrine-Related Cancer* 17, R123-R139.
- Ampuja M, Jokimäki R, Juuti-Uusitalo K, Rodriguez-Martinez A, Alarmo E & Kallioniemi A. 2013. BMP4 inhibits the proliferation of breast cancer cells and induces an MMP-dependent migratory phenotype in MDA-MB-231 cells in 3D environment. *BMC Cancer* 13, 1-13.
- Anderson GJ & Darshan D. 2008. Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nature Chemical Biology* 4, 15-16.
- Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. 2009. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Research* 69, 5820-5828.
- Beck SE, Jung BH, Del Rosario E, Gomez J & Carethers JM. 2007. BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21WAF1 stabilization and modulated by RAS/ERK. *Cellular Signalling* 19, 1465-1472.
- Bieniasz M, Oszejca K, Eusebio M, Kordiak J, Bartkowiak J & Szemraj J. 2009. The positive correlation between gene expression of the two angiogenic factors: VEGF and BMP-2 in lung cancer patients. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 66, 319-326.
- Boden SD. 2005. The ABCs of BMPs. *Orthopaedic Nursing / National Association of Orthopaedic Nurses* 24, 49-52; quiz 53-4.
- Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J & Nohe A. 2011. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cellular Signalling* 23, 609-620.
- Chirasani SR, Sternjak A, Wend P, Momma S, Campos B, Herrmann IM, et al. 2010. Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of stem-like glioblastoma cells. *Brain : A Journal of Neurology* 133, 1961-1972.
- Debnath J, Muthuswamy SK & Brugge JS. 2003. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods (San Diego, Calif.)* 30, 256-268.

- Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. 2010. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39, 425-435.
- Duggal R, Geissinger U, Zhang Q, Aguilar J, Chen NG, Binda E, et al. 2013. Vaccinia virus expressing bone morphogenetic protein-4 in novel glioblastoma orthotopic models facilitates enhanced tumor regression and long-term survival. *Journal of Translational Medicine* 11, 155.
- Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K & Miyazono K. 2013. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? *Pathology International* 63, 287-296.
- Fang X, Sittadjody S, Gyabaah K, Opara EC & Balaji KC. 2013. Novel 3D co-culture model for epithelial-stromal cells interaction in prostate cancer. *PloS One* 8, e75187.
- Feeley BT, Krenek L, Liu N, Hsu WK, Gamradt SC, Schwarz EM, et al. 2006. Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 38, 154-166.
- Gasiorowski JZ, Murphy CJ & Nealey PF. 2013. Biophysical cues and cell behavior: the big impact of little things. *Annual Review of Biomedical Engineering* 15, 155-176.
- Gordon KJ, Kirkbride KC, How T & Blobe GC. 2009. Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2. *Carcinogenesis* 30, 238-248.
- Goumans MJ & Mummery C. 2000. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *The International Journal of Developmental Biology* 44, 253-265.
- Guo D, Huang J & Gong J. 2012. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry* 363, 179-190.
- Gutierrez-Barrera AM, Menter DG, Abbruzzese JL & Reddy SAG. 2007. Establishment of three-dimensional cultures of human pancreatic duct epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 698-703.
- Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kimura K, Kanno A, Masamune A, et al. 2007. Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *Journal of Cellular Physiology* 213, 768-774.
- Hanavadi S, Martin TA, Watkins G, Mansel RE & Jiang WG. 2007. The role of growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its analog, GDF-9b/BMP-15, in human breast cancer. *Annals of Surgical Oncology* 14, 2159-2166.
- Hardwick JC. 2008. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. 8, 806-12.
- Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ & Mundy GR. 1994. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells. *The Prostate* 24, 204-211.
- Haubold M, Weise A, Stephan H & Dunker N. 2010. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling in retinoblastoma cells. *International Journal of Biological Sciences* 6, 700-715.

- Haudenschild DR, Palmer SM, Moseley TA, You Z & Reddi AH. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP)-6 signaling and BMP antagonist noggin in prostate cancer. *Cancer Research* 64, 8276-8284.
- Haycock JW. 2011. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 695, 1-15.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313-323.
- Herrera B, van Dinther M, Ten Dijke P & Inman GJ. 2009. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Research* 69, 9254-9262.
- Hongisto V, Jernström S, Fey V, Mpindi J, Kleivi Sahlberg K, Kallioniemi O, et al. 2013. High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 8, e77232.
- Hsu MY, Rovinsky S, Penmatcha S, Herlyn M & Muirhead D. 2005. Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil? *Cancer Metastasis Reviews* 24, 251-263.
- Hughes CS, Postovit LM & Lajoie GA. 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 1886-1890.
- Hung TT, Wang H, Kingsley EA, Risbridger GP & Russell PJ. 2008. Molecular profiling of bladder cancer: involvement of the TGF-beta pathway in bladder cancer progression. *Cancer Letters* 265, 27-38.
- Jacquemet G, Humphries MJ & Caswell PT. 2013. Role of adhesion receptor trafficking in 3D cell migration. *Current Opinion in Cell Biology; Cell Adhesion and Migration* 25, 627-632.
- Joensuu H, Roberts PJ, Teppo L & Tenhunen M. 2007. *Syöpätaudit*. 3 Edition. Kustannus Oy Duodecim. Jyväskylä.
- Kallioniemi A. 2012. Bone morphogenetic protein 4 - a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genetics* 205, 267-277.
- Kang Y & Massague J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-279.
- Kawamura C, Kizaki M & Ikeda Y. 2002. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. *Leukemia & Lymphoma* 43, 635-639.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology* 1, 84-96.

- Ketolainen JM, Alarmo EL, Tuominen VJ & Kallioniemi A. 2010. Parallel inhibition of cell growth and induction of cell migration and invasion in breast cancer cells by bone morphogenetic protein 4. *Breast Cancer Research and Treatment* 124, 377-386.
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P & Langenfeld J. 2003. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 24, 1445-1454.
- Le Page C, Ouellet V, Madore J, Ren F, Hudson TJ, Tonin PN, et al. 2006. Gene expression profiling of primary cultures of ovarian epithelial cells identifies novel molecular classifiers of ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 94, 436-445.
- Lee J, Cuddihy MJ & Kotov NA. 2008. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 14, 61-86.
- Liu L, Zhang J, Xiao Z, Dai B, Sun M, Chen L, et al. 2013. Three-dimensional collagen scaffold enhances the human adenoid cystic carcinoma cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* n/a-n/a.
- Longati P, Jia X, Eimer J, Wagman A, Witt MR, Rehnmark S, et al. 2013. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer* 13, 95-2407-13-95.
- Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, Braig S, Schubert T, Weiss TS, et al. 2009. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *The Journal of Pathology* 218, 520-529.
- Maegdefrau U & Bosserhoff AK. 2012. BMP activated Smad signaling strongly promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Experimental and Molecular Pathology* 92, 74-81.
- Massague J, Seoane J & Wotton D. 2005. Smad transcription factors. *Genes & Development* 19, 2783-2810.
- McPherson K, Steel CM & Dixon JM. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 321, 624-628.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S & Heldin CH. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *Journal of Cell Science* 114, 4359-4369.
- Owens P, Polikowsky H, Pickup MW, Gorska AE, Jovanovic B, Shaw AK, et al. 2013. Bone Morphogenetic Proteins stimulate mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion. *PloS One* 8, e67533.
- Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D, Nagashima AC, Hopfner U, Grubler Y, et al. 2003. Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1034-1039.

- Pardali K, Kowanetz M, Heldin CH & Moustakas A. 2005. Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). *Journal of Cellular Physiology* 204, 260-272.
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. 2006. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-765.
- Polyak K & Weinberg RA. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews.Cancer* 9, 265-273.
- Pouliot F & Labrie C. 2002. Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1,Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells. *The Journal of Endocrinology* 172, 187-198.
- Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, et al. 2004. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 23, 3024-3032.
- Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M & Bosserhoff AK. 2005. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Research* 65, 448-456.
- Serebriiskii I, Castello-Cros R, Lamb A, Golemis EA & Cukierman E. 2008. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix Biology : Journal of the International Society for Matrix Biology* 27, 573-585.
- Shepherd TG & Nachtigal MW. 2003. Identification of a putative autocrine bone morphogenetic protein-signaling pathway in human ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *Endocrinology* 144, 3306-3314.
- Shirai YT, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K & Miyazono K. 2011. Bone morphogenetic protein-2 and -4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma. *The American Journal of Pathology* 179, 2920-2930.
- Siegel R, Naishadham D & Jemal A. 2013. Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63, 11-30.
- Singh A & Morris RJ. 2010. The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21, 299-313.
- Smalley KS, Lioni M & Herlyn M. 2006. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.Animal* 42, 242-247.
- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, et al. 2006. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14842-14847.

- Sung KE, Su X, Berthier E, Pehlke C, Friedl A & Beebe DJ. 2013. Understanding the impact of 2D and 3D fibroblast cultures on in vitro breast cancer models. *PLoS One* 8, e76373.
- Takino T, Guo L, Domoto T & Sato H. 2013. MT1-MMP prevents growth inhibition by three dimensional fibronectin matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436, 503-508.
- Theriault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML & Nachtigal MW. 2007. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 28, 1153-1162.
- Tsuchida R, Osawa T, Wang F, Nishii R, Das B, Tsuchida S, et al. 2013. BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene*.
- Virtanen S, Alarmo EL, Sandstrom S, Ampuja M & Kallioniemi A. 2011. Bone morphogenetic protein -4 and -5 in pancreatic cancer--novel bidirectional players. *Experimental Cell Research* 317, 2136-2146.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr & Kinzler KW. 2013. Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)* 339, 1546-1558.
- von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, et al. 2009. E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 137, 361-71, 371.e1-5.
- Wen Z, Liao Q, Hu Y, You L, Zhou L & Zhao Y. 2013. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas / Sociedade Brasileira De Biofisica ...[Et Al.]* 46, 634-642.
- Wormann SM & Algul H. 2013. Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology* 3, 282.
- Wozniak M & Keely P. 2005. Use of three-dimensional collagen gels to study mechanotransduction in t47d breast epithelial cells. *Biological Procedures Online* 7, 144-161.
- Xu T, Yu CY, Sun JJ, Liu Y, Wang XW, Pi LM, et al. 2011. Bone morphogenetic protein-4-induced epithelial-mesenchymal transition and invasiveness through Smad1-mediated signal pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Medical Research* 42, 128-137.
- Yamada KM & Cukierman E. 2007. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 130, 601-610.
- Zhang J, Ge Y, Sun L, Cao J, Wu Q, Guo L, et al. 2012. Effect of bone morphogenetic protein-2 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *International Journal of Medical Sciences* 9, 184-192.